



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“EVALUACIÓN DE NANOESFERAS LIPÍDICAS
COMO VECTOR DE FÁRMACOS ANSIOLÍTICOS
(CLONAZEPAM)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

G E R A R D O L E Y V A G Ó M E Z

ASESOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por su gran contribución para mi formación académica y personal. Constituye para mí una casa pluricultural donde empecé a conocer y discernir sobre lo que ocurría en mi entorno y principalmente en mi interior. A través de la Universidad he logrado la mayoría de mis propósitos académicos y parte de mi comprensión sobre la estructura que constituye a nuestro universo.
- A mi asesor, el Dr. David Quintanar Guerrero por haber compartido sus conocimientos, experiencia y paciencia. Además, por haber constituido para mí un ejemplo razonable de ser humano. *Muchas Gracias*.
- A mis sinodales Dra. Adriana Ganem Rondero, Q. F. B. Luis Mendoza Romero, M. C. Elizabeth Piñón Segundo y a el Dr. Rafael Villalobos García por las sugerencias observadas para el mejoramiento de este trabajo.
- A el Técnico Rodolfo Rofles del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la FESC – Campo 1 por su atención y recomendaciones.
- A Psicofarma S. A. de C. V. por la donación del principio activo
- A el pQ. F. B. Carlos Yañez Ledesma, pQ. F. B. Jorge Alberto Vilchis Peñalosa y a la Dra. Luisa Martínez Aguilar del área de farmacología de la FES Cuautitlán – UNAM, con quienes se tuvo una colaboración para el desarrollo de este proyecto en la realización de la evaluación *in vivo* y en el tratamiento estadístico de los datos obtenidos. El trabajo publicado por éste grupo de investigación lleva el título de “Evaluación del efecto de nanopartículas de clonazepam en ratones a través del modelo de plus maze y la prueba de tracción”.

- A mis compañeros de laboratorio: Zaida, Nestor, Clara, Elizabeth Piñón, Elizabeth Jiménez, Marlen, Eddie, Luis Mendoza, Guadalupe Nava, Miriam, José Juan, Luis Arturo, ... etc... etc. Les agradezco por compartirme sus conocimientos y por todos los momentos de alegría y risas.
- A mis amigos Clara, Liliana, Wendy, Pedro, Oscar y Miguel.
- Agradezco a la generación 28 de Q. F. B., me gusto lo que viví, no cambiaría nada.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres: Marcelina Gómez Acosta y Alejandro Silvino Leyva Brigido. Agradezco la educación brindada y el ejemplo de voluntad, sencillez y fortaleza que me dan todos los días. Los quiero mucho.

A Celene Lozano Rivas por la hermandad que hemos logrado, la forma en que hemos crecido y la comprensión que nos tenemos. Te amo mucho.

ÍNDICE GENERAL.

I. RESUMEN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Sistema Nervioso Central	3
2.1.1. Estructura y función	4
2.2. Cerebro	5
2.2.1. Estructura y función	5
2.2.2. Ansiedad	8
2.2.2.1. Cuadro clínico	9
2.2.2.2. Tratamiento	10
2.3. Benzodiazepinas	11
2.3.1. Origen y química	11
2.3.2. Indicaciones	13
2.3.2.1. Actividad ansiolítica	16
2.3.3. Mecanismo de acción y receptores para benzodiazepinas	16
2.3.4. Farmacocinética	19
2.3.5. Clonazepam	20
2.3.5.1. Farmacología	21
2.3.5.2. Posología	22
2.3.5.3. Farmacocinética	23
2.4. Barrera hematoencefálica	24
2.4.1. Estructura	24
2.4.2. Metabolismo	27
2.4.3. Mecanismos de transporte de fármacos a través de la BHE	28
2.4.4. Aspectos farmacológicos de la BHE	33
2.5. Modelo de <i>Plus Maze</i> elevado	33
2.6. Nanotecnología	35

2.7. Transportadores submicrónicos de fármacos	36
2.8. Nuevas estrategias para el transporte de fármacos a través de la BHE	38
2.8.1. Fármacos formulados en nanopartículas dirigidos hacia el cerebro	40
2.8.1.1. Liberación de fármacos a partir de NP's	45
2.8.2. Mecanismos de transporte de nanopartículas conteniendo fármacos a través de la BHE	46
2.9. Nanoesferas lipídicas: Antecedentes y campo de aplicación	49
2.9.1. Importancia de las nanoesferas lipídicas	50
2.9.2. Ingredientes utilizados para elaborar nanoesferas lipídicas	50
2.9.3. Métodos de producción	51
2.9.3.1. Homogenización de alto corte y ultrasonido	51
2.9.3.2. Homogenización a alta presión	52
2.9.3.2.1. Homogenización en caliente	52
2.9.3.2.2. Homogenización en frío	53
2.9.3.3. A partir de microemulsiones	53
2.9.3.4. Nanopellets lipídicos	54
2.9.3.5. Emulsificación-evaporación	55
2.9.3.6. Emulsificación-difusión	55
III. JUSTIFICACIÓN	58
IV. HIPÓTESIS	60
V. OBJETIVOS	61

VI. PARTE EXPERIMENTAL	62
6.1. Materiales y reactivos	62
6.2. Metodología	64
6.2.1. Evaluaciones previas	65
6.2.1.1 Principio activo	65
6.2.1.2. Solubilidad del fármaco	65
6.2.1.3. Espectro de absorción	65
6.2.1.4. Curva de calibración	66
6.2.1.5. Solubilidad del lípido	66
6.2.2. Método de emulsificación – difusión	66
6.2.2.1. Método de emulsificación – difusión a temperatura controlada	66
6.2.2.2. Optimización del método	67
6.2.3. Incorporación del principio activo en las nanoesferas lipídicas	69
6.2.3.1. Determinación del porcentaje de carga óptimo	70
6.2.4. Caracterización	71
6.2.4.1. Morfología (microscopía electrónica de barrido)	71
6.2.4.2. Tamaño de partícula	72
6.2.4.3. Calorimetría Diferencial de Barrido	73
6.2.4.4. Potencial Zeta	73
6.2.5. Evaluación <i>in vivo</i>	76
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
7.1. Resultados previos	79
7.1.1. Principio activo	79
7.1.2. Elección del principio activo modelo a utilizar	79

7.1.3. Solubilidad del fármaco	80
7.1.4. Solubilidad del lípido	82
7.2. Método de emulsificación – difusión	85
7.2.1. Método de emulsificación – difusión a temperatura controlada	85
7.2.2. Optimización del método	88
7.3. Estabilidad de nanoesferas lipídicas blanco	105
7.3.1. Tamaño de partícula	105
7.3.2. Potencial zeta	106
7.4. Incorporación del principio activo en las nanoesferas lipídicas. Porcentaje de carga óptima	108
7.4.1. Estabilidad de nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam	109
7.4.2. Tamaño de partícula y potencial zeta	113
7.5. Caracterización por microscopía electrónica de barrido	116
7.6. Caracterización por calorimetría diferencial de barrido	121
7.8. Evaluación <i>in vivo</i>	127
VIII. CONCLUSIONES	138
IX. PERSPECTIVAS	140
X. REFERENCIAS	142
XI. ANEXOS	156

LISTA DE ABREVIATURAS

ANADEVA	análisis de varianza
Å	angstrom
BHE	barrera hematoencefálica
BZD	benzodiazepina
cm	centímetro
°C	grados centígrados
CLZ	clonazepam
c.v.	coeficiente de variación
D.E.	desviación estándar
EEF	electro encefalograma
F	fármaco
GABA	ácido gama amino butírico
GHz	giga hertzio
H	horas
kg	kilogramo
km	kilómetro
kT	energía térmica (1 kT = 0.026 electrovolts)
LCR	líquido cefalorraquídeo
µm	micrómetros
Mbar	mega bar
MEB	microscopio electrónico de barrido
MEC	metil etil cetona
MED	método de emulsificación-difusión
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
MPa	mega pascal
mV	milivolt
mW	miliWatt
ng	nanogramos
nm	nanómetros

NP	nanopartícula
NP's	nanopartículas
NE's	nanoesferas
o/w	octanol/agua
PA	principio activo
PM	peso molecular
P. ej.	por ejemplo
rpm	revoluciones por minuto
SLN	solid lipid nanoparticles
SNC	sistema nervioso central
tpp	tamaño promedio de partícula
TSF	transportador submicrónico de fármacos
UV	ultravioleta
% p/p	porcentaje peso/peso
% p/v	porcentaje peso/volumen

ÍNDICE DE FIGURAS

-Fig. 1. Estructura general de las benzodizepinas.	12
-Fig. 2. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas.	17
-Fig. 3. Estructura química del clonazepam.	20
-Fig. 4. Comparación de un capilar cerebral con un capilar general.	25
-Fig. 5. Capilar cerebral en sección transversal, constitución de la BHE.	26
-Fig. 6. Mecanismos de transporte a través de la barrera hematoencefálica.	32
-Fig. 7. Modelo de <i>Plus Maze</i> elevado para ratones.	34
-Fig. 8. Escala comparativa de tamaños nano, micro y milimétricos.	36
-Fig. 9. Mecanismos propuestos para incrementar el paso de fármaco a través de la barrera hematoencefálica.	40
-Fig. 10. Tipos de nanopartículas cargadas con fármaco para liberación en el SNC.	44
-Fig. 11. Análisis farmacocinético de la liberación de fármaco a partir de NP's.	45
-Fig. 12. Mecanismos de liberación de fármacos a partir de NP's.	35
-Fig. 13. Método de emulsificación – difusión. Etapas del proceso de elaboración.	57
-Fig. 14. Procedimientos experimentales llevados a cabo.	64
-Fig. 15. Fenómeno del potencial zeta.	74
-Fig. 16. Celda de capilar doblado para la medición del potencial zeta.	76
-Fig. 17. Mecanismo propuesto para la formación de las nanoesferas lipídicas a través del método de emulsificación – difusión.	87
-Fig. 18. Propelas utilizadas del agitador de velocidad variable.	88

-Fig. 19. Efecto en el tamaño promedio de partícula por el tipo de agitación.	89
-Fig. 20. Efecto en el tamaño promedio de partícula por la velocidad de agitación.	90
-Fig. 21. Efecto en el tamaño promedio de partícula por la temperatura del proceso.	91
-Fig. 22. Efecto en el tamaño promedio de partícula por la evaporación de la fase orgánica durante el proceso de elaboración.	93
-Fig. 23. Tamaño promedio de partícula y límites de desviación estándar al 95 %.	93
-Fig. 24. Efecto en el tamaño promedio de partícula por la forma de enfriamiento después del proceso de elaboración.	95
-Fig. 25. Tamaño promedio de partícula y límites de desviación estándar al 95 %.	95
-Fig. 26. Efecto en el tamaño promedio de partícula por el tipo de recipiente principal en que se llevó a cabo el proceso de elaboración.	96
-Fig. 27. Tamaño promedio de partícula y límites de desviación estándar al 95 %.	97
-Fig. 28. Representación de la disposición de las moléculas de poloxámero 407 en una interfase sustancia acuosa – sustancia orgánica.	100
-Fig. 29. Formas de adsorción del poloxámero 407 sobre partículas coloidales.	101
-Fig. 30. Forma de adsorción del poloxámero 407 sobre partículas coloidales para explicar el mecanismo común de estabilización.	102
-Fig. 31. Representación esquemática del mecanismo de crioprotección de los azúcares.	104
-Fig. 32. Tamaño promedio de partícula de las nanoesferas lipídicas sin fármaco evaluado a través del tiempo.	105
-Fig. 33. Potencial zeta de las nanoesferas lipídicas sin fármaco evaluado a través del tiempo.	107

-Fig. 34. Porcentaje de encapsulamiento de clonazepam y su estabilidad con el tiempo (\pm D. E.). NE + CLZ 1 % p/p, NE + CLZ 3 % p/p, NE + CLZ 5 % p/p.	110
-Fig. 35. Eficiencia de atrapamiento de clonazepam y su estabilidad con el tiempo (\pm D. E.). NE + CLZ 1 % p/p, NE + CLZ 3 % p/p, NE + CLZ 5 % p/p.	112
-Fig. 36. Evaluación del tamaño promedio de partícula de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam a través del tiempo (\pm D. E.). NE + CLZ 1 % p/p, NE + CLZ 3 % p/p, NE + CLZ 5 % p/p.	113
-Fig. 37. Evaluación del potencial zeta de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam a través del tiempo (\pm D. E.). NE + CLZ 1 % p/p, NE + CLZ 3 % p/p, NE + CLZ 5 % p/p.	114
-Fig. 38. NE+CLZ 1 % (10, 000x).	118
-Fig. 39. NE+CLZ 1% (30, 000x).	118
-Fig. 40. NE+CLZ 3% (20, 000x).	118
-Fig. 41. NE+CLZ 3% (15, 000x).	118
-Fig. 42. NE+CLZ 3% (30, 000x).	118
-Fig. 43. NE+CLZ 5% (30, 000x).	118
-Fig. 44. NE+CLZ 5% (30, 000x).	119
-Fig. 45. Clonazepam puro (30, 000x).	119
-Fig. 46. Clonazepam puro (10, 000x).	119
-Fig. 47. NE blanco (30, 000x).	119
-Fig. 48. NE blanco (10, 000x).	119
-Fig. 49. CLZ 1% disperso (45, 000x).	120
-Fig. 50. CLZ 3% disperso (45, 000x).	120

-Fig. 51. CLZ 3% disperso (45, 000x).	120
-Fig. 52. CLZ 5% disperso (45, 000x).	120
-Fig. 53. CLZ 5% disperso (45, 000x).	120
-Fig. 54. Termogramas (DSC) de ingredientes y acarreador lipídico; Compritol [®] ATO 888 (a), poloxámero 407 (b) y acarreador lipídico sin fármaco (c).	123
-Fig. 55. Termogramas (DSC) del fármaco y en combinación con el acarreador lipídico; clonazepam puro (d), mezcla física de clonazepam con Compritol [®] ATO 888 y poloxámero 407 (e) y acarreador lipídico con clonazepam (f).	124
-Fig. 56. Termogramas (DSC) del acarreador lipídico con fármaco incorporado en diferentes porcentajes; 1 % (p/p) (g), 3 % (p/p) (h) y 5 % (p/p) (i).	125
-Fig. 57. Termogramas (DSC) comparativos para el desplazamiento del punto de fusión del Compritol [®] ATO 888.	126
-Fig. 58. Termogramas (DSC) comparativos del punto de fusión del clonazepam, las formulaciones del acarreador propuesto y su mezcla física.	126
-Fig. 59. Evaluación <i>in vivo</i> de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam. Porcentaje de entradas en brazos cerrados y abiertos en el modelo de <i>Plus Maze</i> elevado como medida del efecto ansiolítico (n = 12).	128
-Fig. 60. Evaluación <i>in vivo</i> de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam. Porcentaje de permanencia en brazos cerrados y abiertos en el modelo de <i>Plus Maze</i> elevado como medida del efecto ansiolítico (n = 12).	129
-Fig. 61. Mecanismo de digestión de mono, di y triglicéridos.	132
-Fig. 62. Mecanismo del efecto de promoción de absorción de lípidos.	133

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Composición aproximada del cerebro y del músculo.	6
- Tabla 2. Efectos producidos tras la administración de las benzodiazepinas.	13
- Tabla 3. Benzodiazepinas; vida media, uso y dosis recomendada.	14
- Tabla 4. Propiedades farmacológicas del clonazepam.	21
- Tabla 5. Propiedades ideales de NP's poliméricas para la entrega de fármacos a través de la BHE.	42
- Tabla 6. Ejemplos de NP's usadas para la entrega de fármacos a través de la BHE.	43
- Tabla 7. Solubilidad de clonazepam en diferentes fases orgánicas de metiletilcetona y acetato de etilo.	81
- Tabla 8. Solubilidad de clonazepam en disolventes orgánicos.	82
- Tabla 9. Solubilidad cualitativa del Compritol® ATO 888 en la fase orgánica para el método de emulsificación-difusión.	84
- Tabla 10. Tamaño promedio de partícula de nanoesferas lipídicas obtenidas en solventes con diferente coeficiente de partición.	98
- Tabla 11. Tamaño promedio de partícula de nanoesferas lipídicas obtenidas con diferente agente estabilizante.	99
- Tabla 12. Tamaño promedio de partícula de nanoesferas lipídicas obtenidas después de liofilizar con y sin agente crioprotector.	103
- Tabla 13. Potencial zeta y descripción de la estabilidad.	106
- Tabla 14. Estabilidad física de dispersiones de nanoesferas lipídicas con clonazepam.	109
- Tabla 15. Estabilidad física de dispersiones de nanoesferas lipídicas con clonazepam a través del tiempo.	114

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	
— Evaluaciones previas de clonazepam.	
a) Barrido	156
b) Curva de calibración	157
Anexo 2	
— Fórmulas para expresar el fármaco encapsulado.	159
Anexo 3	
— Propiedades del lípido.	160
Anexo 4	
— Propiedades de los estabilizantes:	
a) Poloxámero 407	162
b) Alcohol polivinílico	164
Anexo 5	
— Guía sobre impurezas de disolventes residuales para la industria farmacéutica.	165

I. RESUMEN

Usando la innovación de la nanotecnología se elaboraron nanoesferas lipídicas mediante el método de emulsificación – difusión para utilizarlas como vector de fármacos psicoactivos. El objetivo principal sobre el cual se planteó el proyecto de investigación fue mejorar el paso de clonazepam (fármaco perteneciente al grupo de las benzodiazepinas) a través de la barrera hematoencefálica proponiendo la composición lipídica del acarreador.

Se evaluaron las etapas críticas involucradas en el proceso de emulsificación – difusión y liofilización para obtener las nanoesferas purificadas. Este proceso de optimización consistió en investigar el efecto del tipo y velocidad de agitación durante el proceso de emulsificación – difusión, tipo de contenedor principal (profundidad de agitación), sistema cerrado o abierto (con respecto a la evaporación de la fase orgánica), forma de enfriamiento, tipo de solvente (diferente coeficiente de partición o/w), tipo de agente estabilizante, y adición de un crioprotector durante la liofilización.

Con el poloxámero 407 y el Compritol[®] ATO 888 a 1240 rpm con la propela tipo hélice marina, recipiente principal que permitía una profundidad adecuada de agitación y un sistema abierto, se lograron obtener nanoesferas lipídicas de un tamaño aproximado a 320 ± 30 nm. La forma de enfriamiento no pareció influir en el tamaño promedio de partícula, así como la adición del crioprotector no resultó necesaria.

Mediante la medición del tamaño promedio de partícula y el potencial zeta se determinó que las formulaciones son estables hasta aproximadamente un año (no se evaluó por más tiempo). Las micrografías muestran partículas esféricas y amorfas, corroboran el tamaño submicrónico, y en preparaciones que contienen sólo al clonazepam sin matriz lipídica ni estabilizante se observa la formación de nanocristales del fármaco. Con la técnica de calorimetría diferencial de barrido se

demonstró que el clonazepam se encuentra disperso molecularmente en las nanoesferas lipídicas.

Se obtuvo un porcentaje de encapsulamiento de clonazepam entre 0.07 y 0.7 %, con una eficiencia de atrapamiento de 0.07 – 0.15 %, que permitió tener la cantidad suficiente de fármaco como para administrar una dosis que produjera un efecto ansiolítico.

En conjunto, los resultados de esta investigación demuestran que las nanoesferas lipídicas constituidas por Compritol[®] ATO 888 y estabilizadas con poloxámero 407 presentan un potencial uso como acarreador lipídico, y principalmente para fármacos psicoactivos de alta potencia que no requieran ser administrados en altas cantidades (por el bajo encapsulamiento que se obtiene).

II. ANTECEDENTES

2.1 Sistema Nervioso Central

En el desarrollo del ser humano por las etapas de la evolución, el sistema nervioso ha progresado desde fibras nerviosas simples que conectaban diferentes partes del cuerpo, como sucede en los animales multicelulares primitivos, hasta un sistema nervioso muy complejo que contiene quizá 100 000 millones de neuronas en el ser humano. Al llegar el animal a la etapa multisegmentaria, se agregaron fibras nerviosas y cuerpos celulares neuronales para formar un eje neural a lo largo del cuerpo, que constituyó las bases de la médula espinal en el ser humano, primer nivel de la función del sistema nervioso central.

A continuación, en el extremo cefálico del eje se desarrollaron grandes agregados de neuronas que transmitían señales de regulación por el eje neural hacia todas las partes del cuerpo. Estas partes del sistema nervioso se desarrollaron mucho en peces, reptiles y aves, y son equivalentes a las regiones basales del cuerpo humano, o segundo nivel de la función del sistema nervioso.

Por último, ocurrió un crecimiento explosivo del tejido nervioso alrededor de las regiones basales del encéfalo y se formó la corteza cerebral, que es el tercer nivel de la función. Esto ocurrió primordialmente en los mamíferos, y alcanzó un desarrollo enorme en el ser humano.

Los tres niveles principales de organización del sistema nervioso central son: 1) médula espinal, que se encarga de la regulación de muchos de los patrones reflejos básicos del cuerpo, 2) regiones basales del encéfalo, que regulan la mayor parte de las funciones automáticas complejas del cuerpo, como equilibrio, ingestión de alimentos, grandes movimientos corporales, marcha respiración, etc., y finalmente, 3) corteza cerebral o cerebro propiamente dicho, que alberga

nuestros procesos superiores de pensamiento y regula nuestras actividades motoras voluntarias definidas [1].

2.1.1 Estructura y función

La mayoría de los animales deben monitorear y mantener un medio interno constante, además de responder a un medio externo. En la mayoría de los animales, estas dos funciones son coordinadas por dos sistemas de órganos integrados y coordinados: el sistema nervioso y el sistema endocrino.

Las tres funciones básicas realizadas por el sistema nervioso son:

- 1.- Recepción sensorial del medio interno y externo
- 2.- Integrar las señales recibidas
- 3.- Responder al estímulo

Existen receptores en el sistema nervioso que analizan los cambios en el medio interno o externo. La recepción sensorial se puede dar en varias formas, incluyendo cambio en la presión, sabor, sonido, luz, pH sanguíneo, o niveles hormonales, que son convertidos a una señal y enviados al cerebro o espina dorsal.

En los centros sensoriales del cerebro o en la espina dorsal, la señal es conformada e integrada y se genera una respuesta. La respuesta, un trabajo motor, es una señal transmitida a los órganos que puede convertir la señal hacia algunas formas de acción, como movimiento, cambios en el latido del corazón, liberación de hormonas, etc.

Algunos animales tienen un segundo sistema de control, el sistema endócrino. El sistema nervioso coordina respuestas rápidas a estímulos externos. El sistema endócrino controla respuestas más lentas y prolongadas a estímulos internos. Finalmente la actividad de ambos sistemas se integra.

El SNC es la parte del sistema nervioso que consiste del cerebro y la espina dorsal. Es uno de las dos principales divisiones del sistema nervioso. El otro es el sistema periférico que esta afuera del cerebro y de la espina dorsal. El sistema nervioso periférico conecta el SNC a los órganos sensoriales, otros órganos del cuerpo, músculos, glándulas y vesículas sanguíneas [2].

2.2 Cerebro

El cerebro y la mente son dos aspectos de una misma unidad indivisible, caracterizada por dos palabras: complejidad y maleabilidad; complejidad infinita y maleabilidad suma.

El cerebro del hombre es la estructura más compleja de la creación; sus mecanismos son tan misteriosos como los del mundo sideral o los del mundo atómico. “Con el cerebro del hombre aparece un tercer infinito, el infinito de la complejidad”, que es “tan real como lo Inmenso o lo Infinito” [1].

2.2.1 Estructura y función: aspectos generales

El tejido cerebral posee características notablemente diferentes de las de otros tipos de tejidos, en su composición química total. La tabla 1 presenta la comparación de algunos valores típicos de los constituyentes principales del cerebro de los mamíferos y del músculo. Como se puede ver, el cerebro posee una cantidad significativamente mayor de lípidos y menos proteína que los músculos y la mayoría de los órganos.

Tabla 1. Composición aproximada del cerebro y del músculo [3].

Componentes	Músculo esquelético (%)	Cerebro total (%)
Agua	75	78
Lípidos	4	10
Proteínas	18	8
Carbohidratos	1	1
Sales inorgánicas	1	1
Otros	3 - 5	2

NOTA: Estos valores no tienen en cuenta las variaciones que se llevan a cabo en animales distintos, a diversas edades o en diferentes regiones del cerebro, así como de las diferencias entre los elementos cerebrales neuronales y los no neuronales del cerebro.

La mayor parte del agua se contiene en el interior de las células del sistema nervioso, y solamente un 15% en el LCR y en las regiones extracelulares. Más de la mitad del peso seco del cerebro está compuesto de lípidos. Sin embargo, las grasas sencillas (triglicéridos) se encuentran en el cerebro solamente en muy baja concentración. Los tres grupos más importantes de lípidos cerebrales son el colesterol, los fosfolípidos y los glicolípidos. El colesterol se encuentra normalmente presente en forma de colesterol “libre” (es decir, que no está unido a otras sustancias) y la mayoría se encuentra asociado con las vainas de mielina que cubren las fibras nerviosas. Los fosfolípidos son compuestos que contienen diglicéridos y ésteres fosfóricos y los glucolípidos contienen ácidos grasos, azúcar y otras sustancias. Estos compuestos también se encuentran en forma predominante en las vainas de mielina de las fibras nerviosas [3,4].

El cerebro pesa en promedio 1350 gramos, parece alcanzar su máximo a los 25 años, decreciendo progresivamente hasta llegar a perder un 10% de su peso a los 90 años. En el curso de la evolución han ido aumentando progresivamente la anchura y la altura del cerebro: el crecimiento del cerebro a lo ancho corresponde probablemente a la extensión de las zonas parietal y temporal de la corteza cerebral, llamadas de “asociación”, que son sede de procesos altamente

psíquicos; el desarrollo en la altura del cerebro se ha exteriorizado porque se ha enderezado la bóveda craneana frontal y corresponde al desarrollo de los lóbulos frontales.

El cerebro del hombre difiere del cerebro del mono antropoide, no solamente por la extensión de la corteza cerebral, sino también por el desarrollo de ciertas zonas corticales.

Las diferentes zonas corticales. Las zonas de la corteza cerebral corresponden a cuatro niveles funcionales: 1) las zonas primarias, en relación con el mundo exterior, corresponden a las funciones sensitivas, táctiles, visuales, auditivas, o a las funciones motoras, en las que reina una somatotopía precisa: cada punto de la corteza cerebral corresponde a un punto del organismo. Como regla general, las regiones correspondientes a una exigencia funcional superior, ó a una mayor sensibilidad, ocupan una superficie cortical más extensa. 2) Las zonas secundarias están unidas y enlazadas con las precedentes; los puntos de la corteza no corresponden ya a una superficie cutánea o a un músculo, sino a la síntesis de las sensaciones superficiales y profundas o a una función muscular, flexión, extensión, rotación de la cabeza y de los ojos. 3) Las zonas terciarias son también especializadas y rodean a las anteriores; su función sensitiva es la gnosia, es decir la asociación y el reconocimiento de las informaciones procedentes de diversos modos sensoriales; su función motora es la praxia, es decir la coordinación de los gestos. 4) Las zonas superiores no tienen relación con el mundo exterior y no están especializadas, sino que sus funciones son globales; en ellas se elabora el pensamiento: utilización de los recuerdos, conceptos y abstracciones; expresión verbal, gráfica y gestual. El paso de la animalidad a la humanidad, que se produjo en el Africa austral de dos a tres millones de años atrás, es el resultado de la extensión de las zonas no especializadas de la corteza cerebral, en la que se registra la experiencia y se programa la acción.

En el cerebro se encuentran las estructuras especializadas para el funcionamiento de toda la actividad inteligente del humano, y se localizan en diferentes áreas de

los lóbulos y de los hemisferios. Dichas estructuras se relacionan e interconectan con el sistema límbico, parte del cerebro que posibilita saber quiénes somos y qué deseamos [1].

2.2.2 Ansiedad

Quizá la alteración psicológica más frecuente en los seres humanos es la ansiedad. El término ansiedad, proviene del latín *anxietas*, “congoja” o “aflicción”. Consiste en un estado de malestar psicofísico caracterizado por una sensación de inquietud, intranquilidad, inseguridad o desosiego ante lo que se vivencia como una amenaza inminente y de causa indefinida. La diferencia básica entre la ansiedad normal y la patológica, es que ésta última se basa en una valoración irreal o distorsionada de la amenaza. Cuando la ansiedad es muy severa y aguda, puede llegar a paralizar al individuo, transformándose en pánico.

Con el propósito de aliviar este padecimiento, se han desarrollado sustancias capaces de modificar los efectos producidos por la ansiedad. Para el análisis farmacológico de tales sustancias se utilizan varios modelos de tipo conductual, los cuales simulan situaciones de conflicto y ansiedad en animales experimentales. Cuando el fármaco es capaz de reducir o controlar dicho cuadro, éste se considera como ansiolítico.

En los últimos años las benzodiazepinas, fármacos con acciones sobre los sistemas GABAérgicos cerebrales, han mostrado una gran eficacia en el tratamiento de la ansiedad, angustia y depresión. Por esta razón son considerados como fármacos ansiolíticos clásicos, que sirven de patrón de referencia para los nuevos compuestos con posibles acciones ansiolíticas [5].

2.2.2.1 Cuadro clínico

La ansiedad puede ser una emoción normal y un trastorno psiquiátrico, dependiendo de su intensidad y de su repercusión sobre la actividad de la persona. En condiciones normales, constituye uno de los impulsos vitales que motiva al individuo para realizar sus funciones y enfrentarse a situaciones nuevas.

La ansiedad se convierte en patológica cuando adquiere tal categoría que, en lugar de favorecer el comportamiento, lo interfiere y cuando alcanza tal protagonismo que el individuo desplaza hacia ella toda su atención.

En términos patológicos, la ansiedad puede describirse como la vivencia de un sentimiento de amenaza, de expectación tensa ante el futuro y de alteración del equilibrio psicosomático en ausencia de un peligro real o, por lo menos, desproporcionada en relación con el estímulo desencadenante. En ella coexisten, en proporción diversa, varios componentes: a) un sentimiento penetrante de aprensión, temor o angustia, frente a algo que se valora como amenazante; b) un estado de irritación que puede llegar a la pérdida de la capacidad de concentración, y c) un conjunto de síntomas somáticos variables: sudoración, palpitaciones, fatiga, micciones frecuentes, cefalea, insomnio, molestias digestivas, etc. [6]

La ansiedad es una emoción normal que se experimenta en situaciones en las que el sujeto se siente amenazado por un peligro externo o interno. Habría que diferenciar entre miedo (el sujeto conoce el objeto externo y delimitado que le amenaza y se prepara para responder) y ansiedad (el sujeto desconoce el objeto, siendo la amenaza interna y existiendo una dificultad en la elaboración de la respuesta). La ansiedad es anormal cuando es desproporcionada y demasiado prolongada para el estímulo desencadenante [7, 8].

2.2.2.2 Tratamiento

Fármaco ansiolítico es aquel que alivia o suprime el síntoma de ansiedad sin producir sedación o sueño. Sedante o tranquilizante menor que se emplea fundamentalmente para el tratamiento de los episodios de ansiedad como los barbitúricos, las benzodiazepinas, la clormezanona, la hidroxicina, el meprobamato y el tibatamato.

Un ansiolítico (del latín *anxius*, "angustiado", y el griego λυτικός, "que disuelve") o tranquilizante menor es un fármaco con acción depresora del sistema nervioso central, destinado a disminuir o eliminar los síntomas de la ansiedad. Algunos de los más conocidos son taquicardia, sensación de ahogo, insomnio, etc. Estas manifestaciones clínicas pueden variar para cada uno de los trastornos de ansiedad puntuales. Algunos de los desórdenes de ansiedad más importantes son: trastorno de ansiedad generalizada, fobias específicas, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad social. Los ansiolíticos suelen indicarse para tratar estos desórdenes, sobre todo a corto plazo, pero no son el único recurso farmacológico disponible para este propósito. Estos mismos agentes se indican adicionalmente para otros fines, según sus propiedades farmacológicas, por ejemplo para tratar el trastorno bipolar, la epilepsia y otras enfermedades mentales.

Los dos grandes grupos de esta clase son los barbitúricos y las benzodiazepinas (BZD). En la actualidad, los ansiolíticos que gozan de mayor reputación son las BZD. El Lexatin, perteneciente a este grupo, es el ansiolítico comercial más recetado en España. Antes del descubrimiento de esta familia, los barbitúricos eran los agentes ansiolíticos por excelencia. Éstos se caracterizan por una mayor incidencia de efectos secundarios, ya que producen una depresión más generalizada del sistema nervioso.

Los barbitúricos tienen un margen de seguridad muy estrecho; por esto se registraron en la literatura especializada numerosos casos de sobredosis

accidentales. La intoxicación aguda por ingesta de barbitúricos se ha relacionado históricamente con una tasa de mortalidad inaceptable para los parámetros de la medicina actual. La evaluación riesgo-beneficio, motivó su abandono definitivo como agente ansiolítico. Sin embargo, este balance resulta aún favorable en lo que respecta a su potencial terapéutico como anticonvulsivante, para casos específicos que no responden a la terapéutica convencional [9].

2.3 Benzodiazepinas

2.3.1 Origen y química

Las BZD fueron sintetizadas por el químico polaco Sternbach en los Laboratorios Hoffman la Roche, en Nutley, Nueva Jersey; y comercializada a partir de 1957. Otra de las sustancias más antiguas de este grupo es el meprobamato. Éstas se recetaron ampliamente para dolencias relacionadas con el estrés durante los años sesenta y setenta. En 1977, por ejemplo, en E.U.A. se fabricaron 800 toneladas de BZD. Estos fármacos se preferían a los barbitúricos porque tenían un menor potencial de adicción y efectos secundarios relativamente menores. Pero la principal ventaja de las BZD es su gran margen de seguridad terapéutica. Sin embargo, efectos secundarios como la somnolencia, la ataxia, la confusión, el vértigo, son habituales. Además, se ha establecido que su uso prolongado produce dependencia. Otros ejemplos de BZD son: alprazolam, lorazepam, bromazepam, flunitrazepam, oxazepam. En el año 1961 se introdujeron en el mercado farmacéutico el clordiazepóxido y en 1963, el diazepam. A partir de entonces se han sintetizado más de 3000 compuestos [10].

Todas las benzodiazepinas poseen un mismo anillo heptagonal (figura 1, anillo B), el núcleo benzodiazepínico, con dos nitrógenos, que según su disposición permite distinguir entre: 1,4-benzodiazepinas (con nitrógenos en posición 1 y 4, las 1,5-benzodiazepinas y las 3,4-benzodiazepinas. Todos estos compuestos presentan un mismo perfil farmacodinámico, pero sus propiedades farmacocinéticas son

diferentes. Por ello, las diferencias existentes entre los distintos derivados son más cuantitativas que cualitativas [6].

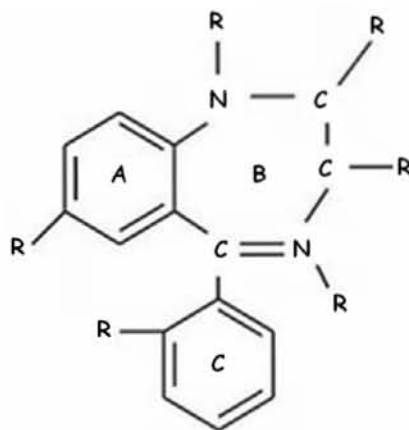


Fig. 1. Estructura general de las benzodiazepinas (R, radical; A, B y C son la distinción de anillos heterocíclicos) [11].

Las 1,4-benzodiazepinas fueron las primeras en sintetizarse e introducirse en clínica. Según las diferentes estructuras químicas de las 1,4-benzodiazepinas se pueden distinguir varios subgrupos:

- a) Imidazobenzodiazepinas (midazolam)
- b) Nitrobenzodiazepinas (nitrazepam, flunitrazepam, clonazepam)
- c) Oxacinobenzodiazepinas (ketazolam)
- d) Oxazolobenzodiazepinas (oxazolam, cloxazolam)
- e) Tienobenzodiazepinas (brotizolam)
- f) Triacinobenzodiazepinas (triazolam, alprazolam, adinazolam, estazolam)

Todas las benzodiazepinas en mayor o menor medida son sustancias liposolubles y de carácter básico, excepto el oxazepam y el lorazepam, que son anfóteros y pueden descomponerse por su exposición a la luz [10].

2.3.2 Indicaciones

Las BZD son una clase de fármacos con efectos hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, amnésicos y miorelajantes (tabla 2).

Tabla 2. Efectos producidos tras la administración de las benzodiazepinas [12].

Acción	Uso clínico
Ansiolítico (para aliviar la ansiedad)	Ansiedad y trastornos de pánico, fobias
Hipnótico (para facilitar el sueño)	Insomnio
Miorelajante (para la relajación muscular)	Espasmos musculares, trastornos espásticos
Anticonvulsivo (contra los ataques, las convulsiones)	Ataques causados por intoxicación a causa de la ingestión de drogas, algunas formas de epilepsia
Amnesia (deterioro de la memoria a breve plazo)	Premedicación antes de operaciones, sedación en de intervenciones de cirugía menor

Esta familia incluye gran cantidad de moléculas que comparten estas propiedades; terapéuticamente, se les ha asignado usos específicos, de acuerdo a las ventajas relativas que puedan mostrar unas respecto de otras (tabla 2). Por ejemplo, el clonazepam tiene un perfil muy eficaz como ansiolítico en el tratamiento de trastornos de pánico o ansiedad generalizada, además del uso tradicional como anticonvulsivo.

El hecho de que sus propiedades hipnóticas, miorelajantes y amnésicas sean relativamente más débiles que entre las otras benzodiazepinas, le confiere un perfil de efectos secundarios mejor tolerado cuando se utiliza como ansiolítico o anticonvulsivo (tabla 3). Por eso tiene esas indicaciones, mientras que, como miorelajante, por ejemplo, suele optarse por el diazepam. Tanto el clonazepam como el diazepam son fármacos con una vida media de eliminación prolongada (más de 24 horas).

Tabla 3. Benzodiazepinas; vida media, uso y dosis recomendada [12].

Benzodiazepinas	Vida media (en horas) [metabolito activo]	Objetivo de comercialización	Dosis oral equivalente aproximada (en mg)
Alprazolam (Xanax [®] , Alplax [®])	6-12	Ansiolítico	0.5
Bromazepam (Lexotanil [®])	10-20	Ansiolítico	5-6
Clordiazepóxido (Librium [®])	5-30 [36-200]	Ansiolítico	25
Clobazam (Frisium [®])	12-60	Ansiolítico, anticonvulsivo	20
Clonazepam (Clonopin [®] , Rivotril [®])	18-50	Ansiolítico, anticonvulsivo	0.5
Clorazepate (Tranxene [®] , Nansius [®])	[36-200]	Ansiolítico	15
Diazepam (Valium [®])	20-100 [36-200]	Ansiolítico	10
Estazolam (ProSom [®])	10-24	Hipnótico	1-2
Flunitrazepam (Rohipnol [®])	18-26 [36-200]	Hipnótico	1
Flurazepam (Dalmane [®])	[40-250]	Hipnótico	15-30
Halazepam (Paxipam [®] , Alapryl [®])	[30-100]	Ansiolítico	20
Ketazolam (Anxon [®])	2	Ansiolítico	15-30
Loprazolam (Somnovit [®])	6-12	Hipnótico	1-2
Lorazepam (Ativan [®])	10-20	Ansiolítico	1
Lormetazepam (Noctamid [®] , Loramet [®])	10-12	Hipnótico	1-2
Medazepam (Nobrium [®])	36-200	Ansiolítico	10
Nitrazepam (Mogadon [®])	15-38	Hipnótico	10
Nordazepam (Nordaz [®])	36-200	Ansiolítico	10
Oxazepam (Serax [®] , Serenid [®] , Serepax [®])	4-15	Ansiolítico	20

Prazepam (Centrax [®])	[36-200]	Ansiolítico	10-20
Quazepam (Doral [®] , Quiedorm [®])	25-100	Hipnótico	20
Temazepam (Restoril [®] , Normison [®])	8-22	Hipnótico	20
Triazolam (Halcion [®])	2	Hipnótico	0.5
Fármacos no-benzodiazepínicos con efectos similares ^{4,5}			
Zaleplon (Sonata [®])	2	Hipnótico	20
Zolpidem (Ambien [®] , Stilnoct [®])	2	Hipnótico	20
Zopiclona (Zimovane [®] , Imovane [®])	5-6	Hipnótico	15

La larga permanencia de las BZD en los tejidos puede representar un problema. El diazepam, por ejemplo, puede alcanzar vidas medias superiores a las cien horas. Incluso en caso de perfecto funcionamiento visceral, muchas BZD se transforman en dimetildiazepina, que posee una vida media de 70 horas. En particular, en caso de embarazo, aunque se interrumpa el uso, la concentración de la droga en plasma seguirá siendo elevada por varias semanas después de la concepción.

Para el tratamiento del insomnio a corto plazo suele recurrirse a BZD de acción corta y ultra-corta, que promuevan una rápida conciliación del sueño (efectos hipnóticos), pero tengan una vida media relativamente breve en el organismo, de modo que no produzcan somnolencia residual al día siguiente, como el triazolam o el midazolam. Actualmente, tiende a utilizarse en estos casos una nueva clase de fármacos hipnóticos, relacionados funcionalmente con las BZD, que incluyen al zolpidem, la zopiclona y el zaleplón [12].

2.3.2.1 Actividad ansiolítica

El consumo de BZD como ansiolítico es muy elevado. Prácticamente todas las BZD presentan la misma eficacia, pero el modo de utilizarlas varía en función de la duración del efecto y de la relación o posibilidad de separación del efecto sedante.

Sólo está indicado cuando el trastorno no ha respondido al tratamiento no farmacológico y es severo, incapacitante o somete al individuo a tensión inaceptable. La ansiedad o tensión asociadas con el estrés de la vida cotidiana generalmente no requieren tratamiento con un ansiolítico [6].

2.3.3 Mecanismo de acción y receptores para BZD

La acción molecular de las BZD se basa en dos hechos fundamentales: facilitan la transmisión fisiológica de carácter inhibitorio mediada por GABA y se fijan en el SNC a sitios específicos con una afinidad que guarda estrecha relación con su potencia ansiolítica.

Las BZD facilitan la transmisión mediada por GABA, mediante una acción sinérgica ejercida a nivel postsináptico.

En cuanto a los receptores específicos en el SNC para las BZD, éstos forman parte del complejo ácido gamma-aminobutírico o GABA. El GABA es un neurotransmisor con acción inhibitoria, y sus receptores forman parte de un sistema bidireccional inhibitorio conectado entre diversas áreas del SNC. Las BZD potencian la acción inhibitoria mediada por el GABA. Los receptores de las BZD se distribuyen por todo el cerebro y la médula espinal; también se encuentran en las glándulas adrenales, riñones, glándula pineal y plaquetas.

Todas las BZD (figura 2) actúan aumentando la acción de ésta sustancia química natural del cerebro. El mensaje que el GABA transmite es un mensaje de inhibición: le comunica a las neuronas con las que se pone en contacto que

disminuyan la velocidad o que dejen de transmitir. Como más o menos el 40% de los 100 000 millones de neuronas del cerebro responden al GABA, esto significa que el GABA tiene un efecto general tranquilizante en el cerebro: de cierta forma, es el hipnótico y tranquilizante natural con que cuenta el organismo. Las BZD aumentan esta acción natural del GABA, ejerciendo de esta forma una acción adicional (frecuentemente excesiva) de inhibición en las neuronas [12,6].

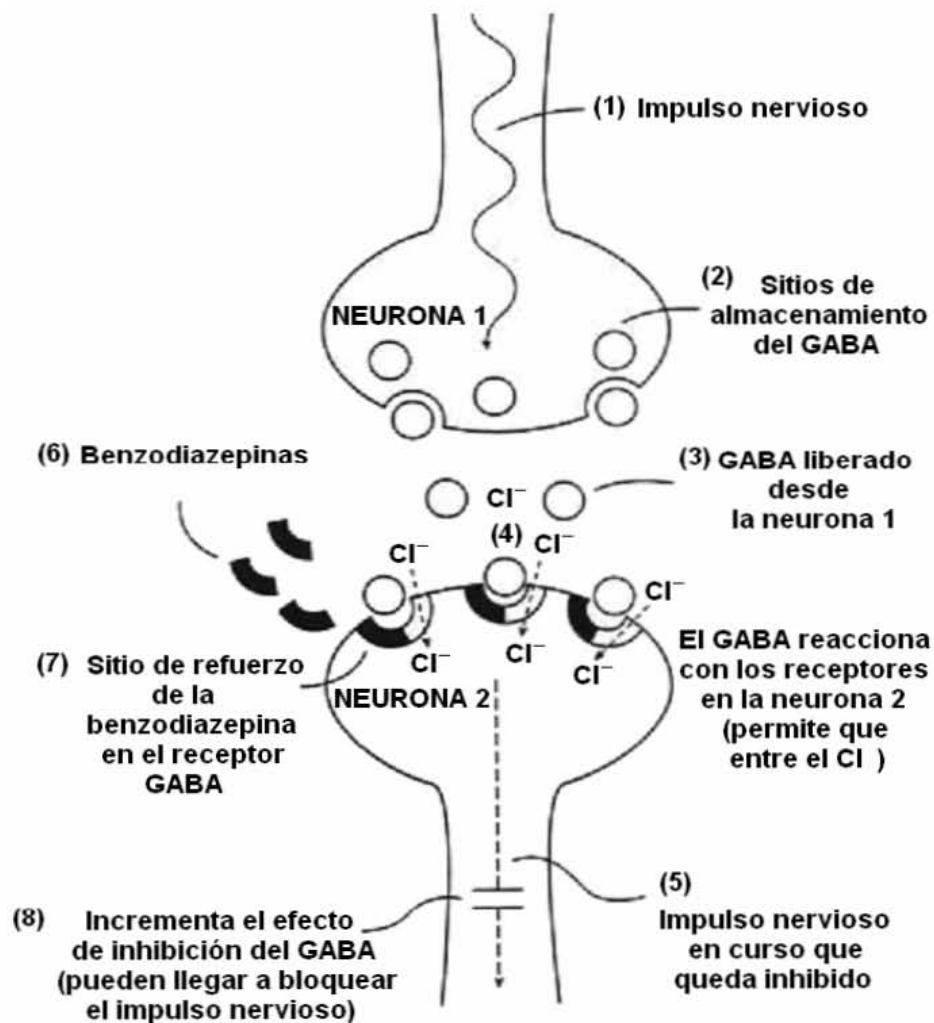


Fig. 2. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas [12].

(1,2) Impulso nervioso que hace que el GABA sea liberado de los sitios en que está almacenado en la neurona 1.

(3) El GABA liberado en el espacio interneuronal.

(4) El GABA reacciona con los receptores de la neurona 2; la reacción permite la entrada de los iones de cloruro (Cl⁻) en la neurona.

(5) Este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso.

(6,7) Las benzodiazepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA.

(8) Esta acción aumenta los efectos inhibidores del GABA; el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente.

La interacción del clonazepam con los receptores GABA ubicados en la parte exterior de la neurona que lo recibe abre un canal, permitiendo así que las partículas con carga negativa (iones de cloruro) entren en la neurona. Estos iones negativos "sobrecargan" la neurona, debilitando la respuesta de la misma a otros neurotransmisores que, en condiciones normales, la excitarían.

Las BZD también reaccionan en sus propios sitios especiales (receptores benzodiazepínicos) que precisamente están ubicados en los receptores GABA. La combinación de una BZD con su receptor potencia la acción del GABA, lo cual permite que entre en las neuronas una mayor cantidad de iones de cloruro, aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación. Los distintos subtipos de receptores benzodiazepínicos tienen acciones levemente distintas. Uno de estos subtipos, (el α -1) es el responsable de los efectos sedativos, otro (el α -2) es el que ejerce efectos ansiolíticos, mientras que ambos, el α -1 y el α -2, como también el α -5, son los responsables de los efectos anticonvulsivos. Todas las

BZD se combinan, en mayor o menor grado, con todos estos subtipos y todas aumentan la actividad del GABA en el cerebro [13].

Como resultado de este incremento de la actividad inhibitoria del GABA causada por las BZD, disminuye la producción cerebral de neurotransmisores excitativos, incluso se reduce la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina, acetilcolina y dopamina. Estos neurotransmisores excitativos son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, tono muscular y coordinación, respuestas emocionales, secreciones de las glándulas endocrinas, control del ritmo cardíaco y de la tensión sanguínea y para muchas otras funciones, todas las cuales pueden ser perjudicadas por las BZD.

Hay otros receptores benzodiazepínicos, no relacionados con el GABA, que se encuentran en el riñón, colon, células sanguíneas y corteza suprarrenal, y que pueden ser afectados por algunas BZD. Estos efectos directos e indirectos son responsables de los bien conocidos efectos adversos causados por el uso de este grupo de fármacos [14].

2.3.4 Farmacocinética

Las BZD se absorben bien por vía oral. El tiempo que tardan en alcanzar las concentraciones máximas oscila entre 30 minutos y 6 horas. La biodisponibilidad oral de las BZD fluctúa entre el 75 y el 100%. Por vía intramuscular su absorción es muy irregular y existe el riesgo de que precipiten, por lo que pueden obtenerse niveles plasmáticos más bajos que los obtenidos tras la administración oral.

En la práctica clínica, la vía intramuscular no es recomendable. Algunas BZD se pueden usar por vía intravenosa. Esta vía se reserva para casos de urgencia. Son muy liposolubles y presentan un elevado volumen aparente de distribución; atraviesan la BHE y alcanzan el tejido cerebral. Se acumulan en el tejido adiposo. Las BZD se unen intensamente a las proteínas plasmáticas (albúmina), entre un

85 y un 100% salvo en el caso del clonazepam (50%) y alprazolam (70%), cuya unión es menor, lo que explica la pequeña fracción de fármaco libre (no unido a proteínas, que es el farmacológicamente activo). Su metabolismo se da en mayor o menor medida por el sistema microsomal hepático. Una de las particularidades de la biotransformación es que la mayor parte de ellas origina metabolitos activos [10].

2.3.5 Clonazepam

La figura 3 muestra la estructura química del clonazepam, (5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona) es un derivado clorado del nitrazepam en la posición 2 del anillo C [15].

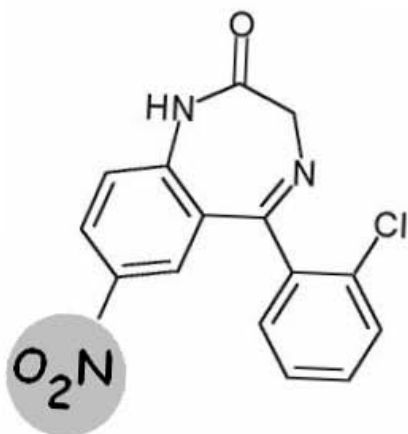


Fig. 3. Estructura química del clonazepam

La tabla 4 resume las propiedades farmacológicas del clonazepam. En estudios de relación estructura actividad de BZD, se ha encontrado actividad biológica por el efecto en particular de la sustitución en la posición 7 del anillo A (figura 4).

Tabla 4. Propiedades farmacológicas del clonazepam [12].

Fórmula química	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃
Peso molecular	315.715
Biodisponibilidad	90%
Metabolismo	Hepático
Vida media	30-40 horas
Excreción	Renal
Categoría embarazo	D
Status legal	Psicotrópico: Lista IV
Vías de administración	Oral e IV

El clonazepam tiene acción terapéutica como ansiolítico, antipánico, antifóbico y anticonvulsivante [12]. Está indicado en:

-Trastorno de Pánico: con o sin agorafobia.

-Trastornos comiciales: solo o como adyuvante, en el tratamiento del síndrome de Lennox-Gastaut (variante del Petit Mal), crisis convulsivas acinéticas y mioclónicas. Puede ser empleado en pacientes con crisis de ausencia (Petit Mal) refractarias a las succinimidas.

-Espasmos infantiles (Síndrome de West), como fármaco de segunda elección [16].

2.3.5.1 Farmacología

El clonazepam posee todos los efectos farmacológicos característicos de las BZD: ansiolítico, sedante, miorelajante y anticomial. Al igual que sucede con las demás BZD, se cree que tales efectos se deben fundamentalmente a la inhibición posináptica mediada por el GABA; los estudios realizados con animales, no

obstante, ponen de manifiesto, además un efecto de clonazepam sobre la serotonina.

De acuerdo con los datos obtenidos en animales y los estudios electroencefalográficos (EEG) realizados en el ser humano, el clonazepam disminuye rápidamente muchos tipos de actividad paroxismal: descargas de puntas y ondas en las crisis de ausencias típicas (petit mal), ondas y puntas lentas, ondas y puntas generalizadas, puntas de localización temporal, así como ondas y puntas irregulares.

El clonazepam suele suprimir las alteraciones EEG generalizadas en forma más constante que las focales.

2.3.5.2 Posología

La dosis de clonazepam debe adaptarse en forma individual para cada paciente de acuerdo a la respuesta clínica y tolerancia. La dosis de mantenimiento será alcanzada luego de un ajuste posológico progresivo, con el objeto de prevenir los efectos adversos al iniciar el tratamiento; se alcanza habitualmente en el curso de 1 a 3 semanas. Se recomienda fraccionar la dosis diaria en dos o tres tomas durante el periodo de ajuste. Una vez alcanzada la dosis de mantenimiento, la misma puede ingerirse en una sola toma al acostarse. Si fuesen necesarias varias tomas diarias se recomienda ingerir la dosis mayor al acostarse.

Actividad anticonvulsiva.

Adultos: La dosis inicial recomendada es de 1 a 2 mg/día, la que será incrementada entre 0,5 a 1 mg cada 3 días hasta alcanzar la dosis de mantenimiento. La dosis habitual es de 2 a 4 mg/día y la máxima de 20 mg/día.

Niños: La dosis inicial para niños de 10 a 16 años o con más de 30 kilos es similar a la de los adultos (1 a 2 mg/día) y la dosis habitual recomendada de 1,5 a 3 mg/día.

Si el clonazepam se utiliza como terapéutica asociada a otros anticonvulsivantes habría que adaptar la dosis de cada fármaco a fin de obtener el efecto deseado.

Trastorno de Pánico, Ansiedad Generalizada y/o Agorafobia.

La dosis debe ajustarse a cada caso particular, recomendándose iniciar con 0,5-1 mg/día en 1 o 2 tomas diarias, hasta alcanzar la dosis efectiva tolerable. La experiencia clínica demuestra un rango posológico de 1 a 5 mg diarios.

2.3.5.3 Farmacocinética

Absorción. Después de la administración oral se absorbe en forma rápida y total. Las concentraciones plasmáticas máximas se registran en la mayoría de los casos al cabo de 1-4 horas de la toma del medicamento. La biodisponibilidad por vía oral es del 90%. Tras la administración diaria de 6 mg (divididos en 3 dosis diarias), las concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio oscilan entre 25 y 75 ng/mL.

Las concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio después de la administración de dosis repetidas pueden llegar a ser cuatro veces (dosis única diaria) u ocho veces (tres dosis diarias) superiores a las observadas tras la administración de una sola dosis.

El efecto óptimo se obtiene con concentraciones plasmáticas de clonazepam de 20-70 ng/mL (promedio: 55 ng/mL, aproximadamente).

Distribución. El volumen medio de distribución de clonazepam se calcula en unos 3L/Kg. Se puede estimar que clonazepam atraviesa la barrera placentaria, y se ha detectado su presencia en la leche materna.

Metabolismo. La transformación metabólica de clonazepam se produce por hidroxilación oxidativa y reducción del grupo 7-nitro, con formación de compuestos 7-amino o 7-acetilamino, que pueden conjugarse para formar nuevos metabolitos. El principal metabolito es 7-amino-clonazepam, con escasa actividad anticonvulsivante. Se han identificado, además, otros cuatro metabolitos, pero en menor proporción.

En un plazo de 4-10 días, se elimina por la orina el 50-70% de la radiactividad total de una dosis oral de clonazepam marcado y por las heces, el 10-30%, casi exclusivamente en forma de metabolitos libres o conjugados. Menos del 0,5% se recupera en la orina en forma de clonazepam inalterado.

Eliminación. La vida media de eliminación oscila entre 20 y 60 horas (promedio: 30 horas) [17].

2.4 Barrera Hematoencefálica

2.4.1 Estructura

En 1885 Paul Ehrlich observó que colorantes como el azul de metileno y otros derivados de las anilinas inyectados intravenosamente teñían la duramadre y otros tejidos del cuerpo, pero no coloreaba el encéfalo ni el LCR. Si la tintura era inyectada directamente en el espacio subaracnoideo por vía intracisternal, se observaba la difusión del colorante a través del LCR con coloración del tejido cerebral [1, 18]

En 1921 Stern y Gautier emplearon el término barrera hematoencefálica para designar una barrera fisiológica que separa el cerebro y el líquido cefalorraquídeo

de sustancias presentes en la sangre. A su vez, el término BHE se ha diferenciado del término barrera hemato-cefalorraquídeo (BHCLR), que supone la existencia de otra barrera funcional entre el encéfalo y el líquido cefalorraquídeo [2].

La primera unidad anatómica que influye sobre la penetración de sustancias al encéfalo es el capilar (figura 4). Las células endoteliales contiguas a los capilares en el encéfalo están interdigitadas (zona ocludens), y no presentan evidencia de poros excepto donde la barrera hematoencefálica no está presente, como en: a) regiones endocrinas y apéndices del encéfalo (eminencia mediana, apófisis y cuerpo pineal; b) en los sitios de formación principal del LCR (plexos coroideos), y c) el área postrema (parte del tallo encefálico en que se origina el reflejo del vómito). Por lo tanto, cualquier sustancia que entra o sale de los capilares en la mayor parte del sistema nervioso central debe hacerlo atravesando las células endoteliales en vez de pasar entre ellas [19].

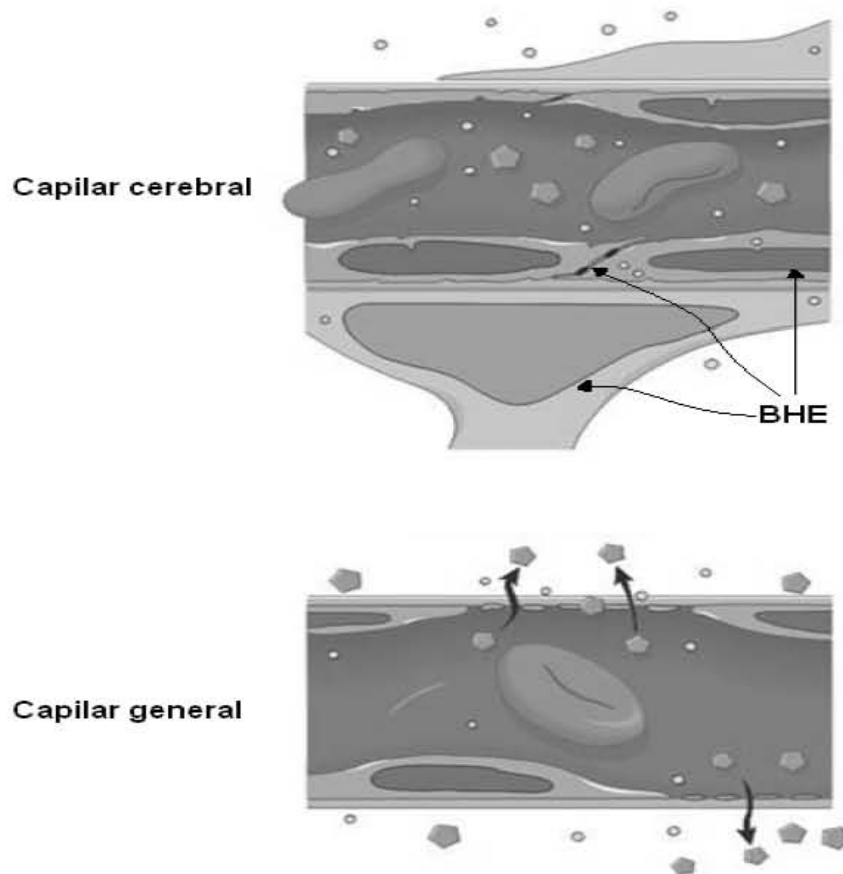


Fig. 4. Comparación de un capilar cerebral con un capilar general

Desde antiguo se ha admitido que la BHE desempeña un papel regulador en el transporte de sustancias y nutrientes entre el árbol circulatorio sistémico y el cerebro.

La BHE (figura 5) consiste en una monocapa de células del lecho capilar que previene la formación de ultrafiltrados plasmáticos. Las células endoteliales del SNC se hallan íntimamente interconectadas por uniones estrechas, carecen de fenestración y muestran pocas vesículas pinocitóticas. Estas características estructurales del endotelio vascular cerebral constituyen una barrera selectiva para controlar el paso de sustancias de la sangre al neuropilo. Las células endoteliales conforman la BHE. Estas células están rodeadas por la membrana basal, dentro de la cual se hallan inmersos los pericitos, mientras que la pared vascular externa se halla cubierta por las prolongaciones podálicas de los astrocitos. A nivel de los plexos coroideos, el lecho capilar no se modifica, pero está rodeado por las células endoteliales que constituyen una barrera adicional, igual que ocurre en zonas selectivas del cerebro conocidas como órganos circunventriculares [20, 21].

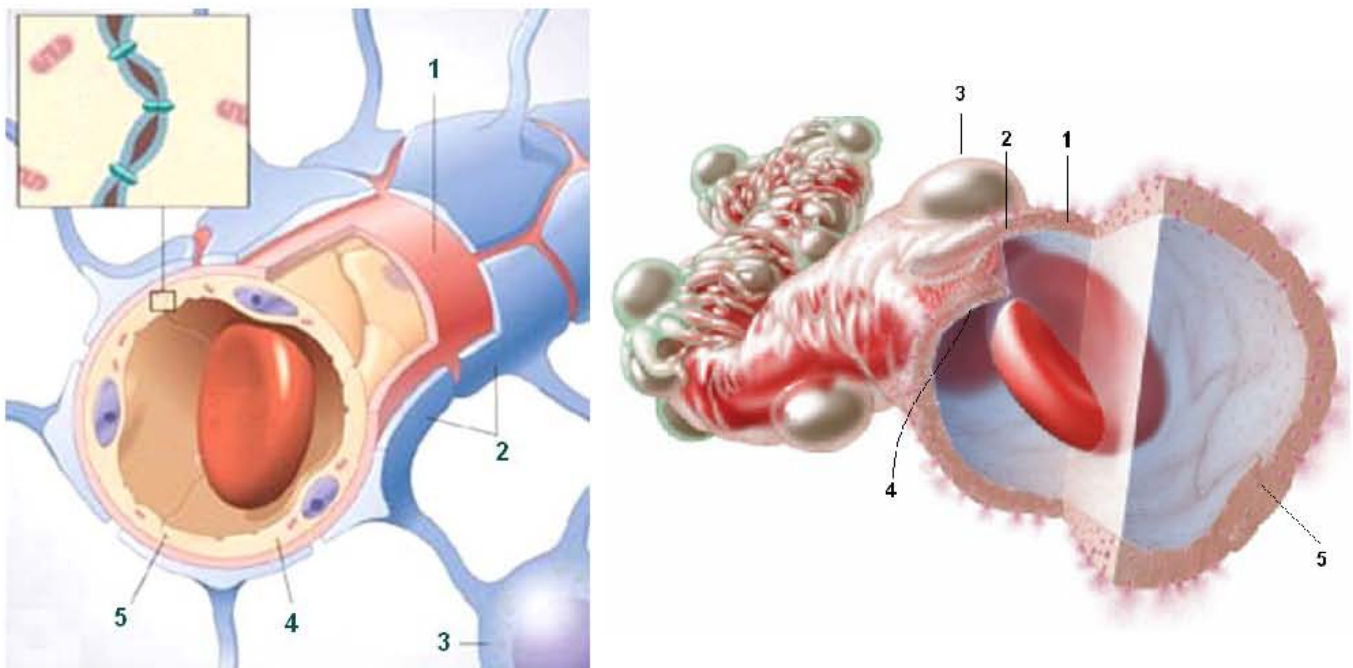


Fig. 5. Capilar cerebral en sección transversal, constitución de la BHE: 1) membrana basal, 2) pies de astrocitos, 3) astrocito, 4) células endoteliales capilares, 5) uniones estrechas [22,23].

Características de la BHE como un epitelio modificado.

1. Es una lámina de células sobre una membrana basal.
2. Las células están conectadas por uniones gruesas.
3. La permeabilidad es baja para las sustancias hidrófilas sin carga eléctrica, en ausencia de transportadores de membrana.
4. Existe un transporte facilitado de ciertos solutos orgánicos que presentan cinética de saturación, esteroespecificidad e interacciones competitivas entre compuestos semejantes.
5. Datos que apoyan la existencia de sólidas uniones epiteliales son: Alta resistencia eléctrica, permeabilidad iónica baja y baja conductancia hidráulica.
6. Estas características son comunes para la BHE y la barrera entre el plexo coroideo y el LCR (barrera hemato-LCR) [24, 25].

2.4.2 Metabolismo

Se ha comprobado desde hace dos décadas que el cerebro sólo oxida glucosa para obtener la energía necesaria que satisfaga su demanda estructural y funcional. En el cerebro adulto, la ración de consumo de oxígeno y glucosa se halla en equilibrio para mantener el metabolismo oxidativo y la producción de oxígeno [3].

Los requerimientos metabólicos y el flujo sanguíneo cerebral suelen correlacionarse, de tal manera que un incremento de la energía se acompaña normalmente de un aumento del flujo sanguíneo, mientras que una reducción energética conduce a una atenuación del flujo sanguíneo cerebral.

En varias especies animales, incluido el hombre, se ha visto que alteraciones en el sistema de flujo cerebrovascular producen una disfunción paralela en la actividad neuronal. Por lo tanto, para garantizar un normal funcionamiento neuronal, en condiciones fisiológicas, parecen esenciales dos requisitos: (a) un flujo sanguíneo cerebral normal, y (b) la integridad de la BHE [1, 2, 21].

2.4.3 Mecanismos de transporte de sustancias a través de la BHE

La BHE desempeña una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Las sustancias liposolubles entran al cerebro por difusión a través de la lámina endotelial. La mayoría de los nutrientes, que suelen ser hidrosolubles, requieren el concurso de mecanismos de transporte activo para incorporarse al cerebro, existiendo transportadores especializados para glucosa, aminoácidos, ácidos monocarboxílicos y precursores de ácidos nucleicos y aminos, que garantizan el aporte de nutrientes, hormonas y sustancias precursoras de neurotransmisores cerebrales. Por consiguiente, la BHE regula (figura 6) el entorno nutritivo y homeostático del SNC permitiendo el acceso de sustancias a través de tres mecanismos: (i) rutas extracelulares, (ii) difusión plasmalemal, y (iii) sistemas selectivos de transporte.

Las rutas extracelulares funcionan mediante el pasaje residual que ocurre en torno a las células endoteliales, el espacio subaracnoideo y otros puntos de posible trasvase de sustancias desde el torrente sanguíneo. La tasa de pasaje por esta ruta es muy baja, equivalente a la de la albúmina, con un trasiego de sangre a cerebro unidireccional y una constante de entrada (K_i) de 10^{-5} a 10^{-6} mL/g/min. Esto indica que la cantidad de sustancia que se encuentra en 0.01 a 0.001 mL de plasma entra en un gramo de cerebro cada minuto.

La segunda ruta, representada por la difusión a través de membranas, depende de sustancias que entran en la vertiente luminal-sanguínea de las células emergiendo de la parte abluminal o cerebral. Las propiedades de esta difusión plasmalemal

dependen fundamentalmente de las características químicas de cada molécula, su liposolubilidad, sus enlaces hidrogenados, su peso molecular, carga iónica, estructura tridimensional, unión a proteínas y capacidad de autoagregación. Las propiedades de la membrana a través de la cual pasan estas sustancias también importa, sobre todo la carga de superficie y la fluidez de la membrana.

La tercera ruta, altamente selectiva, es la de los sistemas de transporte saturables, como el sistema de las hexosas, que transporta la glucosa al interior del cerebro, o los sistemas para aminoácidos neutros, como la tirosina. Estos sistemas permiten el acceso de sustancias específicas al cerebro con una velocidad 10-1000 veces superior a la que les permitirían otros sistemas no saturables. Una de las características de estos sistemas de transporte selectivo es que se autorregulan en función de la demanda metabólica y cambian en el tiempo, desde las fases de desarrollo hasta la senectud. También están influenciados por neurotoxinas, y cualquier defecto de funcionamiento puede conducir a enfermedades del SNC.

Una función recientemente atribuida a la BHE es su capacidad para controlar el intercambio de moléculas con propiedades informativas, como péptidos y proteínas reguladoras, entre el SNC y la circulación periférica. Ejemplos de estas moléculas son la insulina y la leptina que entran en el cerebro a través de la BHE para controlar las conductas apetitivas; o la metionina-encefalina, que sale del cerebro para controlar las conductas adictivas al alcohol; o también diversas citocinas, que entran y salen del cerebro para regular la red neuroinmune. Algunas células del sistema inmune atraviesan la BHE por diapédesis para ejercer sus funciones lejos de su entorno original.

Otros procesos, como la endocitosis adsorptiva, que ocurren normalmente o son activados por agentes patógenos, también pueden constituir nuevos mecanismos de trasiego molecular a través de la BHE. La BHE muestra una reducida endocitosis comparada con otros tejidos, no obstante, el transporte vesicular (mediado vía receptor, por adsorción ó endocitosis de fluido de fase) tiene una

función importante en la liberación de diversos compuestos hacia el cerebro. Como ejemplo, el hierro en forma enlazada a transferrina es endocitosado hacia el interior de la microvasculatura cerebral a través de un mecanismo mediado por receptores, de manera similar, la insulina y lipoproteínas de baja densidad exhiben también un paso a través de la BHE mediada por receptor. La endocitosis por adsorción es el mecanismo de transporte de cierta proteínas y péptidos en su forma catiónica. La endocitosis por fluido de fase se ha demostrado únicamente en cultivos celulares de BHE proveniente de humano y bovino.

Eflujo de fármacos. Fármacos, nutrientes, metabolitos, péptidos, hormonas y neurotransmisores pueden ser transportados activamente del cerebro a la sangre para mantener la homeostasis cerebral. El transporte activo fuera del cerebro ocurre vía transportadores de transporte activo primario localizados en la BHE, que incluyen a la glicoproteína-P, miembros de la familia de proteínas asociadas a una resistencia multifármacos, transportadores de ácidos monocarboxílicos y transportadores de iones orgánicos. El transporte activo primario en la BHE ha mostrado ser una limitante en la penetración de compuestos terapéuticos como fármacos anti-VIH, analgésicos, antibacteriales, antiepilépticos y agentes anticancerígenos hacia el SNC [26].

La BHE posee una especial permeabilidad para diversos solutos, así, la razón entre las concentraciones LCR/plasma es inversamente proporcional al peso molecular (PM) de las sustancias, un ejemplo de esto es la proporción entre el LCR y el plasma en el caso de la albúmina con P.M. de 69.000 daltons, que es de 1/200 y existiendo relativamente más albúmina que gamma globulinas con P.M. de 150.000 daltons.

Otros factores importantes son las propiedades físicas de los solutos como: la liposolubilidad, su unión a proteínas plasmáticas y su grado de ionización a pH fisiológico. Los solutos hidrosolubles y polares atraviesan la BHE con dificultad a

no ser que dispongan de transportadores especiales como en el caso de la glucosa y los aminoácidos.

La BHE posee una importante regulación osmótica siendo casi libre el paso del agua (el 93% de una sola inyección difunde al encéfalo), pero presentando una importante restricción al paso de los cationes como el sodio o el potasio, que a pesar de poseer transportadores específicos sólo logran el equilibrio con el plasma horas después de la inyección.

Otros factores implicados en la permeabilidad son la carga negativa del capilar cerebral (la albúmina catiónica pasa mejor que la neutra) y el sistema de transporte coroideo, ya que como se ha comentado previamente la relación entre el LCR y el líquido intersticial cerebral es muy estrecha. La BHE y el LCR actúan como un sistema que mantiene la homeostasis del SNC, facilitando la entrada de los metabolitos necesarios e impidiendo su paso o facilitando la excreción de los innecesarios [27, 28, 19].

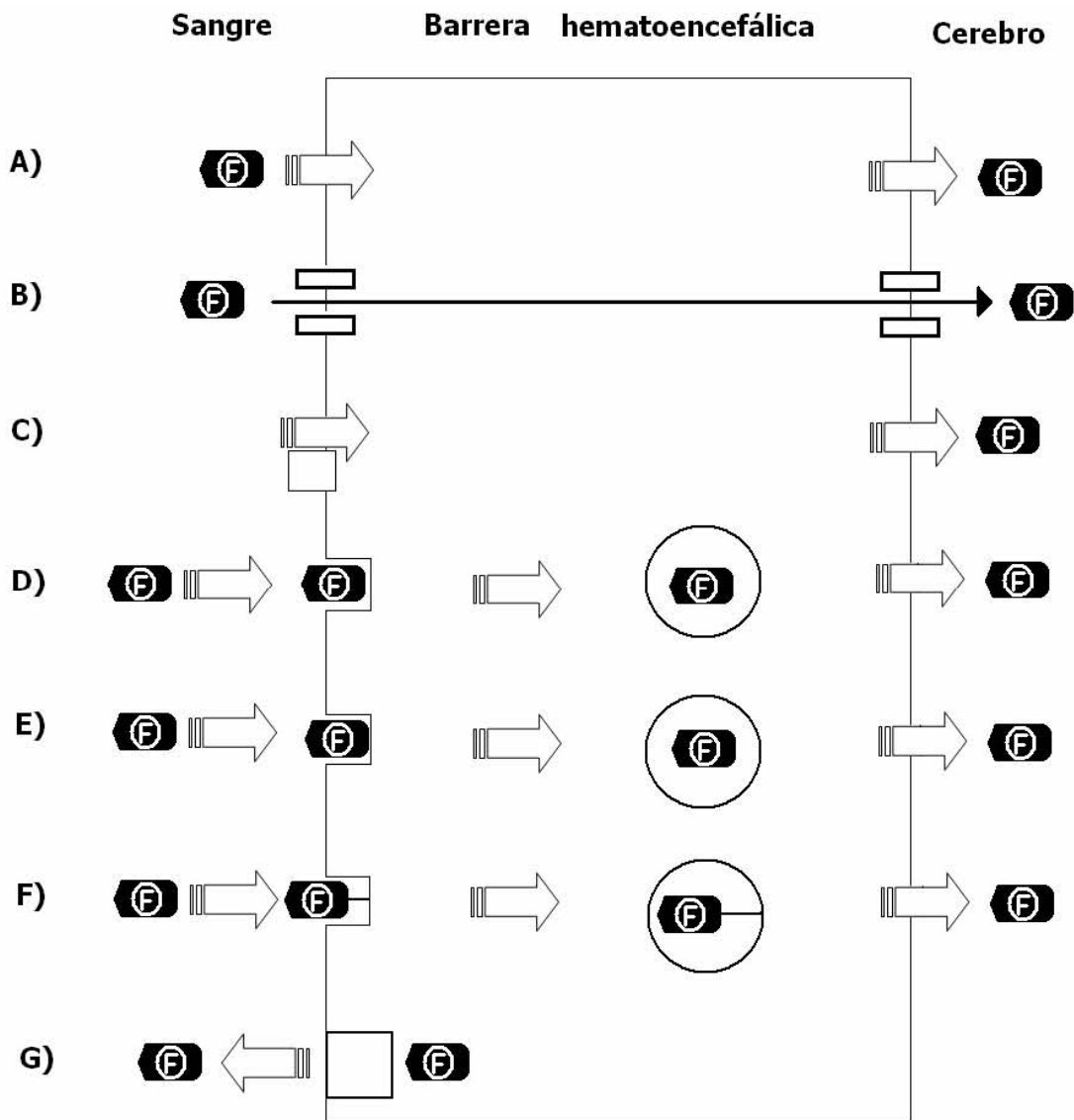


Fig. 6. Mecanismos de transporte a través de la barrera hematoencefálica. (A) difusión transcelular; (B) difusión paracelular; (C) transporte mediado por acarreador; (D) endocitosis por fluido de fase; (E) endocitosis adsortiva; (F) endocitosis mediada por receptor; y (G) transporte activo primario de fármaco [19].

2.4.4 Aspectos farmacológicos de la BHE

No sólo las moléculas biológicas, sino también los fármacos están sometidos a control por la BHE. Los factores a tener en cuenta en la evaluación de su potencial difusibilidad son:

- a) Tamaño molecular y su unión a las proteínas plasmáticas (los fármacos que más se unen atraviesan peor la barrera, ya que sólo la atraviesa la fracción libre);
- b) La solubilidad en lípidos (los polares e hidrosolubles la atraviesan mal y bien los liposolubles como el etanol);
- c) El pH, la acidez o alcalinidad del medio influye en la disociación de fármacos (bases o ácidos débiles), los pH's plasmáticos bajos favorecen el paso de los ácidos al aumentar su concentración no iónica y viceversa con las bases;
- d) Su farmacocinética, los fármacos pueden competir entre si o con diversos sistemas de transporte [29, 30, 31].

2.5 Modelo de *Plus Maze* elevado

El modelo de *Plus Maze* elevado (figura 7) consiste en un laberinto de dos brazos abiertos y dos brazos cerrados por paredes altas, este laberinto es comúnmente usado evaluar comportamientos de ansiedad en animales de laboratorio. Los brazos abiertos son perpendiculares a los brazos cerrados y se intersectan para formar una cruz. Este laberinto generalmente se encuentra a una altura de 45-50 cm. del piso. Los brazos cerrados ofrecen seguridad a los animales, mientras que los brazos abiertos son para exploración.

El comportamiento normal indica que los animales permanecen más tiempo en los brazos cerrados. Cuando se administran fármacos ansiolíticos el tiempo de permanencia en los brazos abiertos aumenta; se ha eliminado la ansiedad y el animal no tiene inhibición alguna, además de que generalmente también son menos activos.

Las mediciones que generalmente se hacen en este modelo son: el número de entradas en los dos tipos de brazos y en el centro; porcentaje de entradas; tiempo de permanencia en cada área [32-42].

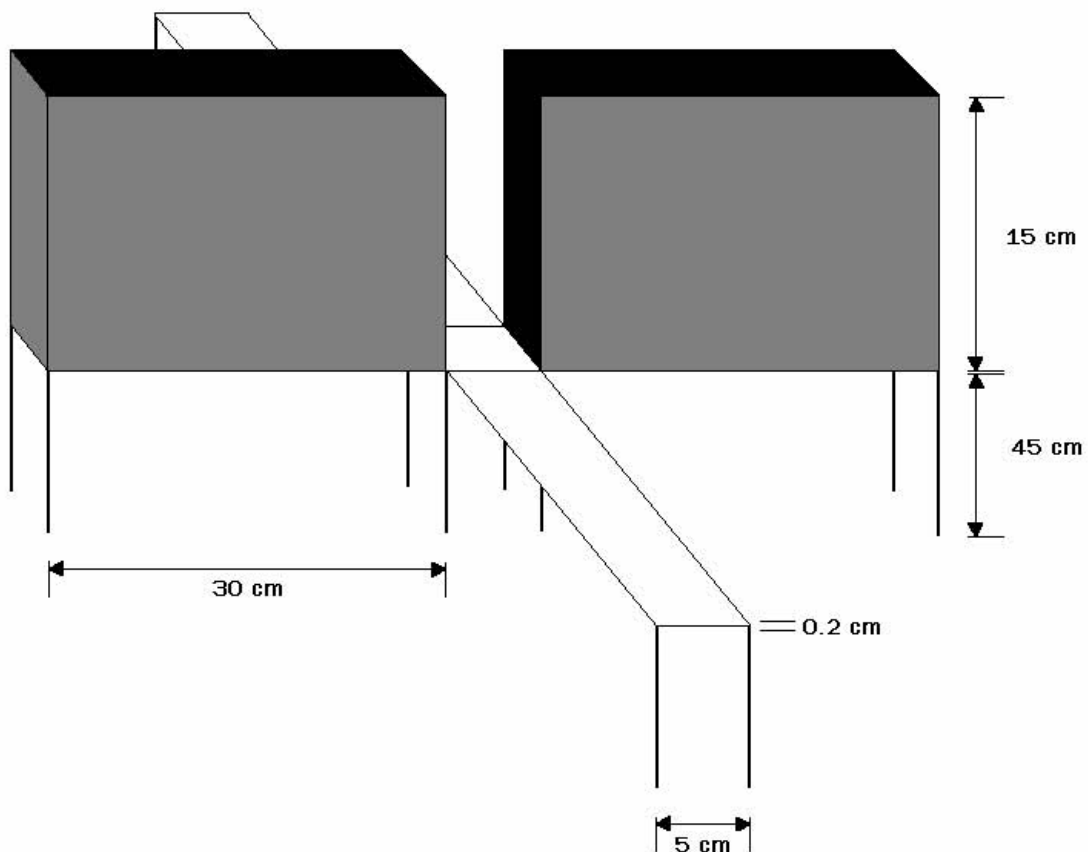


Fig. 7. Modelo de *Plus Maze* elevado para ratones.

2.6 Nanotecnología

La FDA llama nanotecnología a aquello que este involucrado en todo lo siguiente:

- a) Investigación y desarrollo de tecnología a nivel atómico, molecular o macromolecular, en un rango de longitud de escala de aproximadamente 1-100 nanómetros.
- b) Creando y usando estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones nuevas debido a su tamaño pequeño y/o intermedio
- c) Capacidad para controlar o manipular sobre la escala atómica [43].

La investigación en nanotecnología provee una comprensión fundamental de materiales y fenómenos, que facilitan la creación y uso de estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones nuevas debido a su tamaño extremadamente pequeño [44].

En la figura 8, se puede observar que las NP's tienen tamaños menores que las principales células sanguíneas y se encuentran en el tamaño comprendido por los principales constituyentes estructurales del organismo vivo.

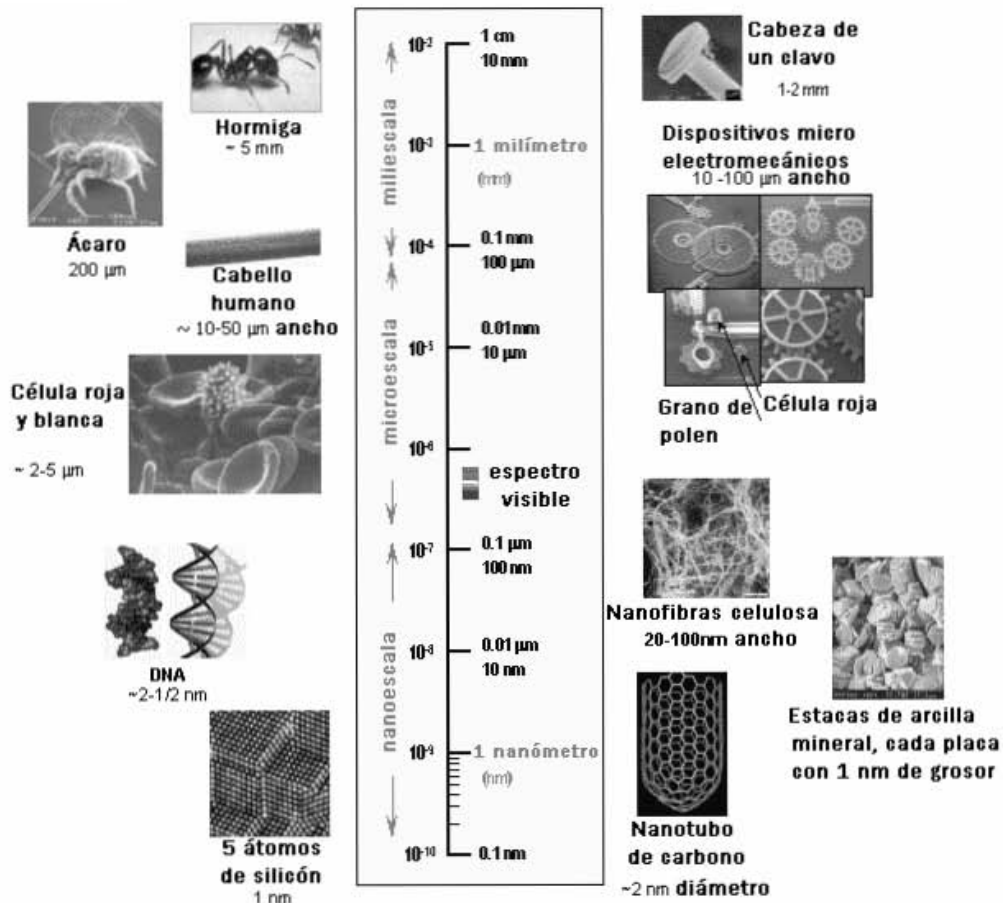


Fig. 8. Escala comparativa de tamaños nano, micro y milimétricos, modificado de [45].

2.7 Transportadores Submicrónicos de Fármacos

La mayoría de los fármacos existentes y candidatos a fármacos tienen una pobre solubilidad en fluidos biológicos, lo cual da como resultado una biodisponibilidad baja y altamente variable. En algunos casos la inyección intravenosa de estos fármacos no es posible por su baja solubilidad. Una de las mejores soluciones para resolver este tipo de problemas es utilizar tecnologías de formulación apropiadas. Diversos grupos de investigación que se encuentran a la vanguardia

del nuevo conocimiento en beneficio de la salud humana se han enfocado en el desarrollo de TSF.

Los TSF son solamente definidos por su tamaño (menor a 1 μm ; aunque otros grupos establecen como límite 0.5 μm), son muy heterogéneos en muchos aspectos (estabilidad termodinámica, composición química, y el estado físico, incluyendo sólidos, líquidos, o dispersiones cristalinas líquidas) y los ejemplos más prominentes son nanopartículas, nanoemulsiones, nanocápsulas, liposomas, nanosuspensiones, micelas, microemulsiones y cubosomas.

El principal objetivo de los TSF es relacionado con:

- a) Incremento en el transporte de fármaco
- b) Posibilidad de liberación controlada
- c) Posibilidad de entrega en el sitio blanco
- d) Incremento de la factibilidad de producción a gran escala
- e) Incremento en la estabilidad física y química de almacenaje
- f) Minimizar por completo los costos

Los transportadores coloidales han atraído una mayor atención durante los últimos años, los sistemas investigados incluyen nanopartículas, nanoemulsiones, liposomas, nanosuspensiones, micelas.

La existencia de diferentes sistemas de transportadores coloidales plantea preguntas como *¿cuál de ellos puede ser el más adecuado para cumplir con las necesidades de nuestro propósito?*. De hecho, no hay una respuesta simple a ésta pregunta. Algunos aspectos a considerar son:

- a) Capacidad de carga del fármaco
- b) Posibilidad de transporte hasta el sitio blanco
- c) Capacidad *in vivo* del transportador (interacción con el medio biológico, grado de degradación, acumulación en órganos)
- d) Toxicidad aguda y crónica

- e) Escalamiento de la producción
- f) Estabilidad física y química de almacenaje
- g) Costo total [46]

2.8 Nuevas estrategias para el transporte de fármacos a través de la BHE

Desde la comprobación de que el cambio en la permeabilidad de la BHE modificando su arquitectura representaba un alto riesgo para la salud [47], se ha optado por estrategias menos riesgosas e igualmente eficaces en el transporte de moléculas (figura 9). Los pro-fármacos son un ejemplo de estas estrategias, la manipulación no compromete la integridad de la BHE, con éste método, el compuesto original es modificado para hacerlo más liposoluble, previéndole de esta manera mayor penetración al SNC. No todos los compuestos pueden ser manipulados ya que existe una alta probabilidad de modificarse su actividad terapéutica y por tanto farmacocinética, y necesitan ser registrados como nuevas entidades químicas. Ante este panorama, resulta evidente que la estrategia alternativa que logra solucionar los problemas anteriores es el uso de acarreadores o transportadores (misma denominación) que incorporan al fármaco, enmascarando sus propiedades ante el formidable grupo de defensa y muralla que representa la BHE, siendo similarmente al caballo de Troya, de ahí, que a estos tipos de sistemas también se les denomine caballo troyanos [48, 49, 50, 51, 52, 53].

Otra alternativa para la liberación de fármacos al cerebro es utilizar acarreadores nativos expresados en la BHE. Los acarreadores nativos de la BHE transportan compuestos grandes e hidrofílicos a través de la barrera como colina, purinas, aminoácidos y lipoproteínas. Se sabe de fármacos que precisamente son transportados por este tipo de acarreadores, ejemplos de ellos son baclofen, melfan, sulfoximina, azaserina y alfa-metil-DOPA. Sin embargo, el número

fármacos con este potencial es limitado debido a que los transportadores muestran alta especificidad por los sustratos. Las NP's pueden atravesar la BHE por difusión pasiva, endocitosis mediada por receptor, entre otros mecanismos, sin una especificidad molecular por un acarreador nativo. Actualmente, es posible diseñar NP's con ligandos sobre la superficie de alta afinidad para estos transportadores, entonces las NP's funcionan como vectores hacia el cerebro o a otro sitio de liberación dirigida [54, 55].

Los transportadores antes mencionados funcionan en la dirección de la sangre al cerebro ó influjo, pero además también existen transportadores de transporte activo primario (como glicoproteína-P, proteínas de resistencia multifármacos, entre otros) también localizados en la BHE para detoxificación y/o prevención de compuestos no esenciales en el interior del cerebro. Mientras que el mecanismo natural es benéfico para el organismo, estos transportadores también muestran especificidad por su sustrato. Se ha propuesto inhibir la aparición de estos transportadores de transporte activo primario para que por estos canales pudiesen atravesar fármacos, sin embargo, la inhibición puede comprometer al SNC o provocar una toxicidad periférica.

La inyección directa hacia el interior del cerebro es otra propuesta para evadir la BHE, incluso fue de las primeras estrategias propuestas y que de manera considerable predomina en la práctica clínica a nivel mundial. Como ejemplos se puede mencionar la infusión intracerebroventricular en el fluido cerebroespinal del factor de crecimiento de nervios en pacientes con Alzheimer, la implantación en el interior del parénquima cerebral de una matriz polimérica conteniendo el factor de crecimiento de nervios. En primera instancia esta técnica representa ventajas en pacientes graves, aunque también la primera desventaja es la neurocirugía extremadamente invasiva, además se cree que la difusión del fármaco del sitio inyectado puede ser una terapia limitante. La aplicación de un campo electromagnético de 2.45 GHz por 45 minutos incrementó la permeabilidad de escopolamina hacia el cerebro por disrupción de la BHE. El campo

electromagnético puede producir un efecto térmico que resulta en un aumento del flujo sanguíneo y en el intercambio en la permeabilidad de la BHE. También se ha demostrado que un incremento de la temperatura interna o aún ambiental logra aumentar la permeabilidad de la BHE [56, 57, 58].

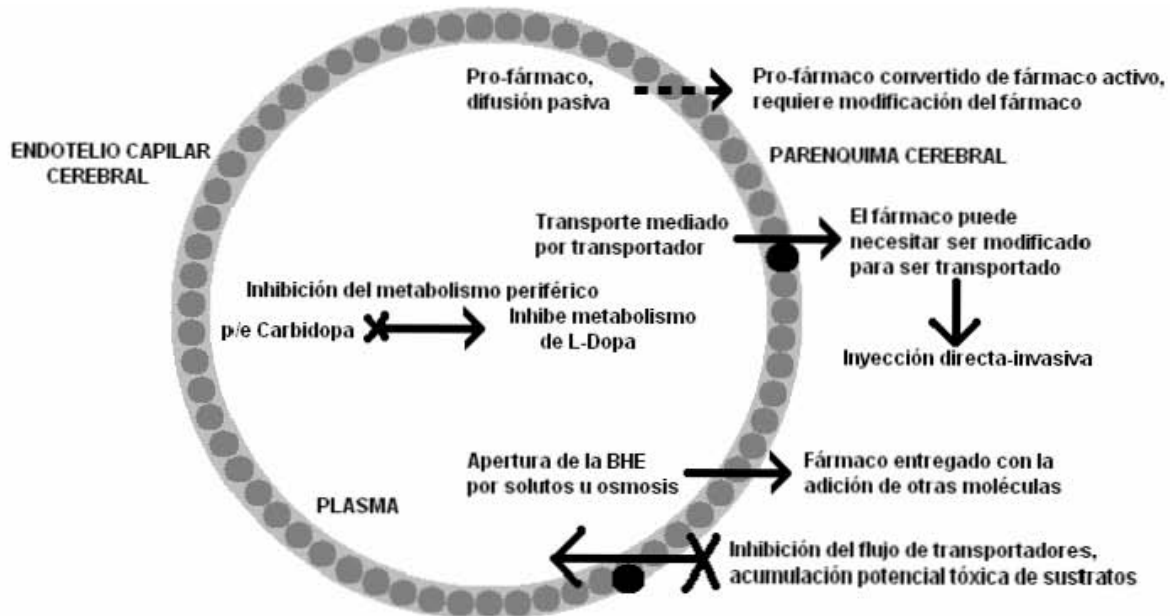


Fig. 9. Mecanismos propuestos para incrementar el paso de fármaco a través de la barrera hematoencefálica, modificado de [59].

El uso de NP's como acarreadores coloidales de fármacos tiene una ventaja decisiva sobre las estrategias propuestas anteriormente para evadir el control de la BHE.

2.8.1 Fármacos formulados en nanopartículas dirigidos hacia el cerebro

El término NP es usado como nombre colectivo para describir tanto nanoesferas (NE's) como nanocápsulas. La diferencia entre estas dos formas es debido a su

morfología y arquitectura de la partícula. Las nanoesferas están formadas por una densa matriz lipídica o polimérica, mientras que las nanocápsulas están compuestas de un centro oleoso cubierto por una membrana polimérica [60]. Para los propósitos de éste estudio se utilizará el término NP para referirse a NE's exclusivamente.

Las NP's son partículas coloidales sólidas con un rango en tamaño de 1 a 1000 nm y son utilizadas como agentes de entrega de fármacos. El uso de NP's para liberar fármacos hacia el cerebro a través de la barrera hematoencefálica (BHE) puede proveer una ventaja significativa a las estrategias actuales. La principal ventaja de la tecnología de transportadores nanoparticulados es que las NP's enmascaran a las moléculas del fármaco de las características limitantes de la BHE. Además, éste sistema puede disminuir la velocidad de liberación del fármaco en el cerebro, disminuyendo la toxicidad periférica.

La tecnología de NP's aparece para dar un significado promisorio en la entrega de moléculas terapéuticas a través de la BHE. En la tabla 5 se listan las propiedades ideales de los acarreadores utilizados para éste propósito.

Las NP's consisten de varias macromoléculas en las cuales las moléculas terapéuticas pueden ser adsorbidas, entrampadas o fijadas covalentemente. Una utilidad de las NP's es para servir como un nuevo transportador para la entrega de fármacos por todos los tejidos del cuerpo. El disfrazamiento del fármaco puede permitir el paso a través de la membrana previamente impermeable. Una vez que las NP's han alcanzado los tejidos deseados, la liberación del fármaco puede ocurrir por desorción, difusión a través de la matriz de la NP o erosión de la NP, o alguna combinación de cualquiera o de todos los mecanismos [59, 61, 62].

Tabla 5. Propiedades ideales de NP's poliméricas para la entrega de fármacos a través de la BHE [59].

-
- a) Polímero sintético o natural
 - b) No muy costoso
 - c) No tóxico
 - d) Biodegradable/biocompatible
 - e) No trombogénico
 - f) No inmunogénico

Diámetro de partícula < 100 nm

Estable en sangre (p/e, no opsonización por proteínas)

Dirigido a la *BHE* (p/e, uso de células ligadas a la superficie, endocitosis mediada por receptor)

No activación de neutrófilos

No agregación de plaquetas

Evitar el sistema reticuloendotelial

No inflamatorio

Tiempo en circulación prolongado

Con posibilidad de ser escalable y costo-efectivo en el proceso de manufactura

Receptivo de moléculas pequeñas, péptidos, proteínas o ácidos nucleicos

Estudios recientes (año 1994 hasta la fecha) sobre el área de investigación discutido en este documento, han evaluado el efecto terapéutico de NP's con anestésicos principalmente, y fármacos con sitio de acción en el cerebro (tabla 6). Como se puede observar, no se tiene reporte hasta el momento sobre el caso específico de la investigación planteada. En la mayoría de los casos el efecto terapéutico se ve incrementado cuando el fármaco es formulado en NP's. Gran parte de las NP's evaluadas son de composición polimérica.

Tabla 6. Ejemplos de NPs usadas para la entrega de fármacos a través de la BHE [59].

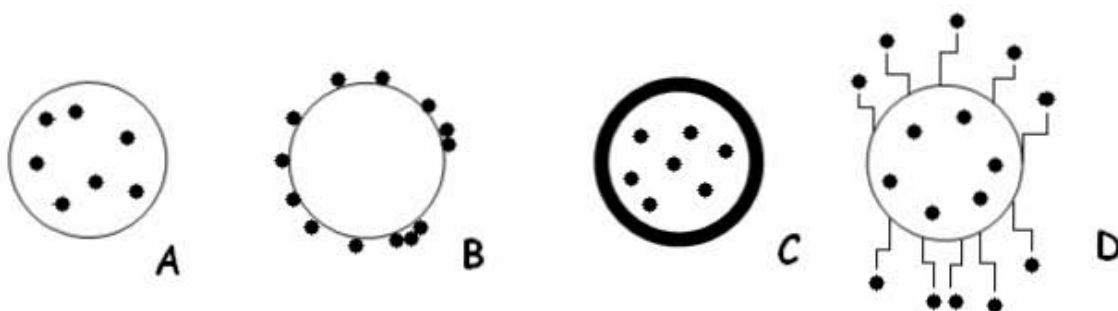
Fármaco evaluado	Tipo de NP	Polímero o estabilizante	Surfactante	Tamaño (nm)	Resultado
Camfotericina	SLN		Poloxámero 188	196.8	Incremento de ABC máx 10.4 a 27 en transporte a través de un modelo <i>in vitro</i> de BHE
Dalargin	SN	Polibutilcianoacrilato	Polisorbato 80	260	Estudio de analgesia, incrementó latencia 50%
Ácido valproíco	SN	Butilcianoacrilato/dextran 70 Kda, polisorbato-8	Polisorbato 80	No evaluado	No incrementó concentración en cerebro
Dalargin, Citorfina	SN	Polibutilcianoacrilato/dextran 70 Kda, polisorbato-8	Polisorbato 80	288 Poli: 80-195 Dextran: 288	Estudio de analgesia, incrementó latencia ~50%
Amitriptilina	SN	Polibutilcianoacrilato/dextran 70 Kda, polisorbato-8	No recubrimiento	Poli: 80-195	Incrementó ABC en cerebro > 50%
Doxorubicin	SLN	Ácido esteárico	Epikuron 200	90	Niveles ~ ¼ del plasmático a las 4 hr vs cero en cerebro sin NP
Dalargin	SN	Polibutilcianoacrilato/dextran 70 Kda	Polisorbato 80	230	Estudio de analgesia, incrementó efecto de analgesia ~50%
Tubocurarina	SN	Butilcianoacrilato/dextran 70 Kda	Polisorbato 80	230	Picos epileptiformes sobre EEG ~ 6mg/kg (brain) en 2-5 hr, vs cero sin transportador
Doxorubicina	SN	Butilcianoacrilato/dextran 70 Kda	Polisorbato 80	270	No incrementó
Nps radiomarcadas	SN	Poli-metilmetacrilato	Poloxámero 338	No evaluado	No incrementó
			Poloxamina 908		No incrementó
			Poloxámero 188		~ 10% Incrementó
			Poloxámero 407		~ 17.5% Incrementó
			Polisorbato 80		~ 15.1% Incrementó

SN: nanoesfera sólida (solid nanoparticle)

SLN: nanoesfera lipídica sólida (solid lipid nanoparticle)

Son posibles varias estructuras de NP's que dependen principalmente del proceso de manufactura empleado (figura 10). El fármaco es adsorbido sobre la superficie de la NP cuando se coloca una dispersión de NP's en una solución saturada del fármaco disuelto, por diferencias de áreas específicas y en términos de estabilidad, el fármaco se adsorberá sobre la superficie de la NP, este es un mecanismo saturable. Es muy probable que cuando se obtienen NP's con fármaco

entrampado ó disperso homogéneamente en el mismo proceso de manufactura se logre adsorber parte de fármaco, por lo que la NP resultante tendrá fármaco adsorbido y además entrampado, esta adsorción posiblemente será menor que cuando se elabora en un proceso meramente adsortivo y hay mayor cantidad de fármaco dispuesto en el medio [59].



- A. NP coloidal sólida con fármaco disperso homogéneamente (nanoesfera)
- B. NP sólida con fármaco adsorbido
- C. Nanocápsula con fármaco entrampado
- D. NP coloidal sólida con fármaco disperso homogéneamente y células ligadas en la superficie

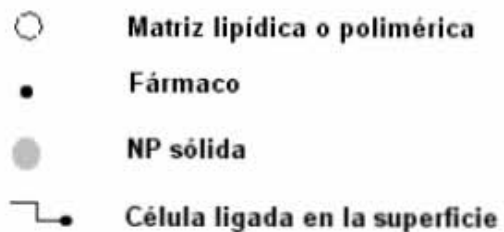


Fig. 10. Tipos de nanopartículas cargadas con fármaco para liberación en el SNC [59].

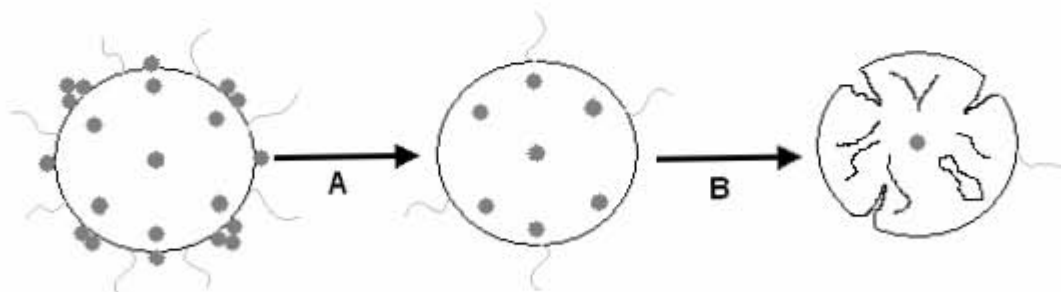
2.8.1.1. Liberación de fármacos a partir de NP's

El análisis farmacocinético de la liberación de doxorubicina a partir de NP's de tipo polimérico fue caracterizado como una ecuación bi-exponencial [59]

$$C_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad \text{Ec. 1}$$

donde C es la concentración de fármaco remanente en la NP a un tiempo dado; A y B son constantes características del sistema, interceptos de la liberación; α es la velocidad inicial; y β es la velocidad secundaria (figura 11).

Este modelo sugiere que hay un removimiento rápido inicial de fármaco de la nanopartícula, posiblemente relacionado a una pronta pérdida de fármaco fijada ligeramente sobre la superficie de la NP (fármaco adsorbido). Una vez que la liberación rápida del componente es completada, hay una más lenta, una liberación mucho más controlada del fármaco debido a la degradación de la matriz que constituye a la NP y difusión del fármaco a través de ésta (figura 12).



- A. Desorción rápida inicial del fármaco sobre la superficie de la NP, efecto conocido como "explosión".
- B. Liberación lenta controlada del fármaco. Caracterizada por fenómenos de orden cero y uno. La liberación es dependiente de la degradación o erosión de la NP

Fig. 11. Análisis farmacocinética de la liberación de fármaco a partir de NP's [59]. Esta última liberación ha sido caracterizada por cinéticas de orden cero y uno.

Las cinéticas de orden cero tienden a ocurrir en NP's biodegradables, la liberación de primer orden ocurre con NP's no-biodegradables. A pesar de la cinética de liberación del fármaco, la liberación parece ser dependiente de la degradación o erosión, y tipo de armazón o estructura de la NP.

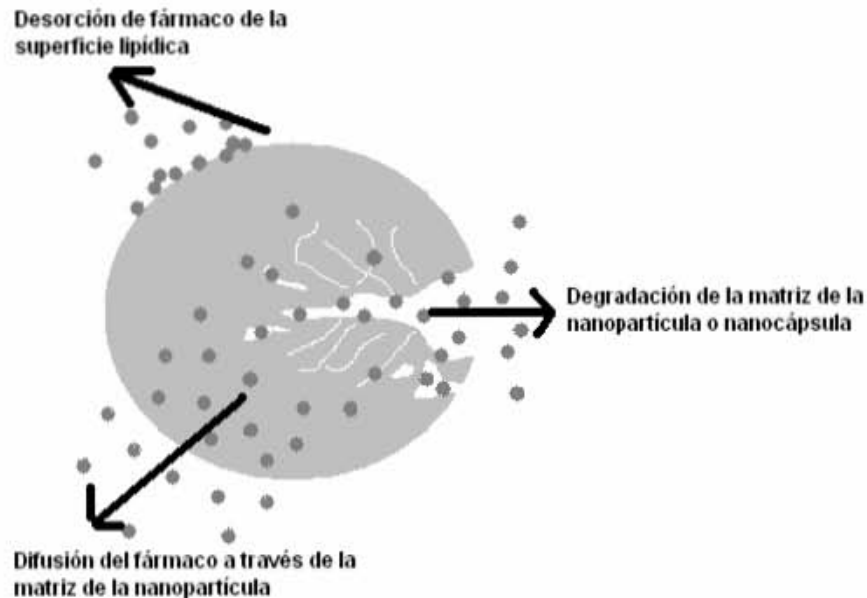


Fig. 12. Mecanismos de liberación de fármacos a partir de NP's, puede ser uno o una combinación de cualquiera o de todos los mecanismos propuestos [59].

2.8.2 Mecanismos de transporte de nanopartículas conteniendo fármacos a través de la BHE

Existen diversas posibilidades que pueden explicar el mecanismo de liberación de fármacos a través de la barrera hematoencefálica:

1.- Un incremento en la retención de las nanopartículas en los capilares sanguíneos del cerebro combinado con una adsorción en las paredes del capilar. Ésto podría crear un gradiente de concentración que podría incrementar el transporte a través de la capa de células endoteliales y se daría como resultado la liberación hacia el cerebro.

2.- Un efecto surfactante general caracterizado por una solubilización de los lípidos que constituyen a la membrana de las células endoteliales y que podría provocar la fluidización de la membrana y por lo tanto un incremento en la permeabilidad de fármacos a través de la barrera hematoencefálica.

3.- Las nanopartículas podrían provocar una apertura de las uniones estrechas de las células endoteliales. El fármaco podría entonces permear a través de estas uniones estrechas en forma libre o también de forma enlazada a las nanopartículas.

4.- Las nanopartículas pueden ser endocitadas por las células endoteliales seguida por la liberación del fármaco en el interior de estas células y posteriormente al cerebro.

5.- Las nanopartículas con el fármaco de alguna manera enlazado pueden ser transcitosadas (paso transcelular) a través de la capa de células endoteliales.

6.- Sustancias como el polisorbato 80 usadas como agentes de recubrimiento pueden inhibir el sistema de transporte de sustancias comunes, especialmente a glicoproteína-P [62].

De los mecanismos mencionados, el 1 y 2 son poco probables que contribuyan según lo observado en la liberación de fármacos a partir de NP's en el cerebro para el caso de loperamida, doxorubicina y tubocurarina. También se cree muy improbable que la creación de regiones locales de alta concentración en los capilares cerebrales (mecanismo 1) pudiese ser suficiente para superar los efectos de las bombas de transporte activo primario localizadas en la membrana luminal de las células endoteliales como lo es la glicoproteína-P. También, es poco común un efecto surfactante general (mecanismo 2), de acuerdo con los experimentos de Kreuter *et al* 1997., que evaluó distintos surfactantes, únicamente las NP's de

dalargin recubiertas con polisorbato provocaron un efecto terapéutico, los otros surfactantes que son buenos agentes solubilizantes no lograron transportar dalargin hacia el cerebro en concentraciones farmacológicamente suficientes [62]. En cuanto a la apertura de las uniones estrechas de la BHE, experimentalmente existen regiones próximas, cuya medición de la actividad sirve como medición indirecta de la integridad de las uniones estrechas, esta región es llamada espacios de inulina (inulin spaces). Se ha demostrado que en estudios con ratas tratadas con NP's cubiertas con polisorbato 80, los espacios de inulina se incrementaron hasta un 99% al cabo de 45 minutos. Este incremento sugirió que las NP's cubiertas incrementaron el volumen disponible para los espacios de inulina intravascular y no se registro una alteración significativa de la BHE. Este incremento se pudo deber a una ligera apertura de las uniones estrechas, un plegamiento (doblamiento) de las membranas celulares debido a eventos endocitóticos, o a un incremento de la endocitosis por fluido de fase de inulina asociada con la internalización de las nanopartículas. En estos experimentos se ha llegado a observar un efecto muy pronto, y es asociado a que cierta cantidad de NP's logran atravesar sin ningún impedimento las uniones estrechas de la BHE [62, 63, 64].

El mecanismo más probable de transporte de fármacos mediado por NP's hacia el cerebro es el mecanismo 4, la endocitosis de las NP's y liberación del fármaco en el interior de estas células. Además, se ha observado de manera característica en esta mismas NP's la adsorción de apolipoproteína E sobre la superficie del polisorbato cuando se encuentran en el torrente sanguíneo, se ha demostrado también que estas NP's no mostraron adsorción de apolipoproteína E cuando no tenían el surfactante y cuando se utilizó poloxámeros. Es probable que la apolipoproteína E interfiera en el transporte de fármacos hacia el cerebro a partir de NP's. La apolipoproteína E transporta de manera natural hacia el cerebro lipoproteínas de baja densidad. Es posible que las NP's cubiertas con polisorbato mimeticen a partículas de lípidos de baja densidad, y de esta manera la

apolipoproteína E los transporte también hacia el cerebro sin distinción alguna. El mecanismo completo es descrito como un acto de caballo troyano [62].

Cabe señalar, que si bien el comentario anterior resultó ser el más coherente en el sentido de poder explicar de una manera un tanto objetiva los resultados experimentales observados en esa investigación, si se observa la tabla 6, se puede notar que también se han evaluado NP's poliméricas de otra composición matricial y estabilizada con poloxámeros, además de NP's lipídicas, y en ambos casos se ha observado un incremento en el efecto terapéutico en otros fármacos debido a las NP's. Esto resulta en pensar que aunque el agente estabilizante que esta en contacto directo con el medio sanguíneo determina diversas reacciones de los componentes plasmáticos que probablemente incrementaran el paso del fármaco por un comportamiento de caballo troyano, también la composición matricial es determinante en el tipo de interacción con los componentes plasmáticos y con la maquinaria estructural y metabólica de la BHE.

2.9 Nanoesferas lipídicas: Antecedentes y campo de aplicación

Las ventajas de las nanoemulsiones incluyen seguridad toxicológica y un alto contenido de la fase lipídica, también como la posibilidad de producción a gran escala usando homogenización de alta presión. Sin embargo, la liberación controlada de nanoemulsiones presenta problemas debido a su tamaño pequeño y el estado líquido del transportador, la liberación controlada a partir de nanoemulsiones requiere fármacos muy lipofílicos (coeficiente de partición octanol/agua mayor a 1,000,000:1) [65].

Por consiguiente, el empleo de lípidos sólidos en lugar de aceites líquidos resulta ser una opción viable para lograr la liberación controlada de fármacos debido a que la movilidad del fármaco en un lípido sólido debería de ser considerablemente menor comparada con un aceite líquido. Además, la estabilidad de ciertos fármacos puede ser mayor en una matriz sólida comparada con un lípido líquido [66, 67, 68, 69, 70, 71].

El grupo de investigación a cargo de Speiser, fue el pionero en desarrollar transportadores lipídicos sólidos, bajo las condiciones de manufactura de éstos transportadores era imposible obtener sistemas con un tamaño de partícula homogéneo, por lo que el área de aplicación de éstos nuevos sistemas era reducido y con riesgos. Pronto se encontró que el homogenizador de alta presión (utilizado anteriormente para la producción de sistemas dispersos micro y nanoparticulados) era más efectivo para la producción de dispersiones submicrónicas de lípidos sólidos que el mezclador de alto corte o ultrasonido; las dispersiones obtenidas de ésta manera son llamadas nanopartículas lipídicas sólidas (nanoesferas lipídicas) y la mayoría se caracterizan por un tamaño de 100 a 200 nm y un bajo contenido de micropartículas [65].

2.9.1 Importancia de las nanoesferas lipídicas

Las nanoesferas lipídicas combinan las desventajas de otros transportadores coloidales y evitan sus desventajas. El propósito de las ventajas incluye:

- a) Posibilidad de liberación controlada y entrega en el sitio específico de fármacos.
- b) Incremento de la estabilidad del fármaco.
- c) Alta carga útil.
- d) Factibilidad de incorporación de fármacos lipofílicos e hidrofílicos.
- e) Ausencia de biotoxicidad del transportador.
- f) No utilizar solventes orgánicos.
- g) Facilitar la producción a gran escala y el proceso de esterilización [72-84].

2.9.2 Ingredientes utilizados para elaborar nanoesferas lipídicas

De manera general las NP's lipídicas se pueden preparar con un fármaco, un lípido sólido, emulsificante y agua. Dependiendo de la aplicación, otros ingredientes pueden estar presentes (agentes osmóticos, matrices para liofilización, buffers, entre otros) [65].

El peligro de toxicidad que puede resultar de los lípidos que integran a las NP's es bajo, porque en general, se utilizan lípidos fisiológicos que son bien tolerados por el cuerpo, ésta característica provee una de las principales ventajas a las nanoesferas lipídicas sobre otros TSF [67-94].

Los lípidos utilizados como ingredientes para las nanoesferas lipídicas pueden ser triglicéridos (P. ej. tristearina), gliceridos parciales (P. ej. monoestereato), ácidos grasos (P. ej. ácido esteárico), esteroides (P. ej. colesterol) y ceras (P. ej. cetil palmitato). El tipo de agente emulsificante depende principalmente de la ruta de administración y es más limitado para la vía parenteral, los tipos más utilizados son poloxámeros, polisorbatos, lectina y ácidos biliares. En muchos casos, la combinación de emulsificantes resulta más eficiente para prevenir la aglomeración de partículas [77, 81, 82].

2.9.3 Métodos de producción

2.9.3.1 Homogenización de Alto Corte y Ultrasonido

La homogenización de alto corte y ultrasonido se usaron inicialmente para la producción de nanodispersiones de lípidos sólidos. Ambos métodos son fácilmente manejables, sin embargo, en la mayoría de los casos se obtiene en ambos distribuciones de tamaño bimodales (dos poblaciones, cada una con diferente tamaño), de las cuales una población se encuentra en el rango micrométrico. En el proceso de ultrasonido también se producen contaminaciones por metales.

Altas velocidades de agitación no cambia significativamente el tamaño de partícula, pero disminuye ligeramente el índice de polidispersidad. No hay una regla general para establecer las condiciones óptimas de emulsificación y enfriamiento. En la mayoría de los casos los tamaños de partícula están en el rango de 100-200 nm

2.9.3.2 Homogenización a Alta Presión

Los homogenizadores de alta presión hacen pasar un líquido movido por presión (10 a 200 MPa) a través de un recipiente muy estrecho (en el rango de unos cuantos micrones). El fluido es acelerado sobre una distancia muy corta a una muy alta velocidad (alrededor de 1000 km/h). La gran fuerza de rompimiento generada fragmenta las partículas hasta el orden nanométrico.

Las nanoesferas lipídicas pueden ser producidas por la técnica de homogenización a alta presión, idénticamente a como se producen las nanoemulsiones parenterales o/w. Ésta es una técnica bien establecida a gran escala desde los años 50's y ya disponible en la industria farmacéutica. Además hay disponible comercialmente homogenizadores de diferentes tamaños de diversos proveedores y a precios razonables. Las líneas de producción para emulsiones parenterales son en la mayoría de los casos equipos con unidades de control de temperatura, porque un incremento en la temperatura facilita la producción de la emulsión. Esto significa que las líneas de producción existentes pueden ser usadas para producir nanoesferas lipídicas por la técnica de homogenización en caliente.

Existen dos métodos básicos de ésta preparación; la técnica de homogenización en caliente y la técnica de homogenización en frío. Para ambas técnicas el fármaco es disuelto o solubilizado aproximadamente 5-10 °C por arriba del punto de fusión del lípido.

2.9.3.2.1 Homogenización en Caliente

Para la técnica de homogenización en caliente, el lípido fundido conteniendo el fármaco es dispersado bajo agitación en una solución acuosa del surfactante que se encuentra a la misma temperatura. Se obtiene una pre-emulsión que es homogenizada usando un

homogenizador de pistón hueco, la nanoemulsión o/w caliente producida es enfriada a temperatura ambiente y cuando el lípido recristaliza produce las nanopartículas.

La técnica de homogenización en caliente es también adecuada para fármacos termolabiles, debido a que la exposición a un incremento de la temperatura es relativamente corta. En caso de compuestos altamente termolabiles, la técnica de homogenización en frío puede ser utilizada.

Cuando se utilizan fármacos hidrofílicos también es necesario utilizar la técnica en frío, de lo contrario la mayor parte de éste estaría en la fase acuosa y no en el lípido fundido.

2.9.3.2 Homogenización en Frío

Para la técnica de homogenización en frío, el fármaco contenido en el lípido fundido es enfriado, el lípido sólido forma micropartículas lipídicas (aproximadamente 50-100 μm) y estos son dispersados en una solución de surfactante, formando así una pre-emulsión. Después ésta pre-emulsión es homogenizada bajo temperatura ambiente, las fuerzas de cavitación son bastante fuertes como para romper directamente las micropartículas lipídicas a nanopartículas lipídicas sólidas.

En el caso de fármacos hidrofílicos, para minimizar su pérdida por distribución hacia la fase acuosa, se puede reemplazar el agua por líquidos que representen baja solubilidad para el fármaco (P. ej. aceites como polietilenglicol 600).

2.9.3.3 Nanoesferas producidas por la técnica de microemulsión

Las microemulsiones son dispersiones compuestas de una fase lipofílica, un surfactante y en la mayoría de los casos un co-surfactante, y agua.

Para formar una microemulsión con un lípido que solidifica a temperatura ambiente, la microemulsión necesita ser producida a una temperatura cercana al punto de fusión del lípido. El lípido (ácidos grasos o glicéridos) es fundido, una mezcla de agua, co-surfactante(s) y el surfactante es calentado a la misma temperatura que el lípido, y se añade bajo agitación moderada al lípido fundido. Un sistema transparente y termodinámicamente estable se forma cuando los ingredientes son mezclados en el porcentaje correcto para la formación de la microemulsión. Ésta microemulsión es entonces dispersada en un medio acuoso frío (2-3 °C) mezclando bajo agitación mecánica moderada, el tamaño pequeño de las partículas es debido a la precipitación y no inducido mecánicamente por un proceso de agitación.

Cuando se utilizan solventes que se distribuyen muy rápidamente en la fase acuosa (P. ej. acetona) se producen nanopartículas, mientras que cuando se utilizan solventes más lipofílicos se obtienen tamaños de partículas más grandes.

Desde el punto de vista técnico, la precipitación de las partículas lipídicas en agua es una dilución del sistema, disminuyendo su concentración. La dispersión de nanoesferas lipídicas puede ser usada como un polvo para granulación, pero en este caso hay un bajo contenido de partículas y se necesita remover una alta cantidad de agua.

2.9.3.4 Nanopellets lipídicos y lipoesferas

Los nanopellets lipídicos son producidos por dispersión de un lípido fundido en una solución de surfactante por agitación o sonicación, en general se obtiene una mezcla de nanopartículas y micropartículas. Para aumentar la cantidad de nanopartículas obtenidas y disminuir la de micropartículas se utiliza una mayor concentración de surfactante (se pretende solubilizar más al lípido). En la producción de estas partículas lipídicas, el surfactante es incorporado en la fase

lipídica, la adición de más surfactante reduce la cristalinidad de las partículas lipídicas.

2.9.3.5 Emulsificación/evaporación

El material lipofílico es disuelto en un solvente orgánico inmiscible en agua (P. ej. ciclohexano) que posteriormente es emulsificado en una fase acuosa para dar una emulsión o/w. Durante la evaporación del solvente mediante presión reducida se forma la dispersión de nanopartículas lipídicas sólidas. Se ha comprobado la reproducibilidad de éste método (Siekman and Westesen) y el diámetro de partícula más pequeño se obtuvo utilizando sales biliares como co-surfactante. El tamaño de partícula promedio depende de la concentración de lípido en la fase orgánica, cuando se incrementa el contenido de lípido disminuye la eficiencia de la homogenización debido a la alta viscosidad de la fase dispersada.

La ventaja de este procedimiento sobre los procesos de homogenización en frío (homogenización a alta presión en frío) es que se evita cualquier sometimiento térmico. Una clara desventaja es el uso de solventes orgánicos [68, 75].

2.9.3.6 Método de emulsificación - difusión

El método de emulsificación-difusión es un proceso de fácil implementación, no requiere de homogenización, utiliza menor temperatura y resulta ser más reproducible, facilitando así su escalamiento [69, 88-95].

En su elaboración se forma una emulsión que posteriormente es desestabilizada por adición de la fase externa en exceso, los componentes de la fase interna pasan a la fase externa y precipitan formando partículas de talla submicrónica, figura 13 [91].

El mecanismo para la formación de las NP's por este método consiste en la difusión rápida de la fase interna de la emulsión (solvente) a la fase externa (agua), creando una región de supersaturación cercana a la interfase en donde se da la formación de las NP's debido a la agregación del lípido en forma de partículas submicrónicas. La composición lipídica de las NP's mejora el transporte de fármacos lipofílicos a su sitio de acción (aumento de biodisponibilidad, menor dosis y costo), los componentes utilizados son muy bien tolerados por el organismo, enmascara las propiedades del fármaco hasta que las NP's son degradadas y el fármaco es liberado, disminuyendo de ésta manera los efectos adversos en órganos periféricos; en general constituyen un sistema de vectorización viable y prometedor aún en desarrollo [89, 91].

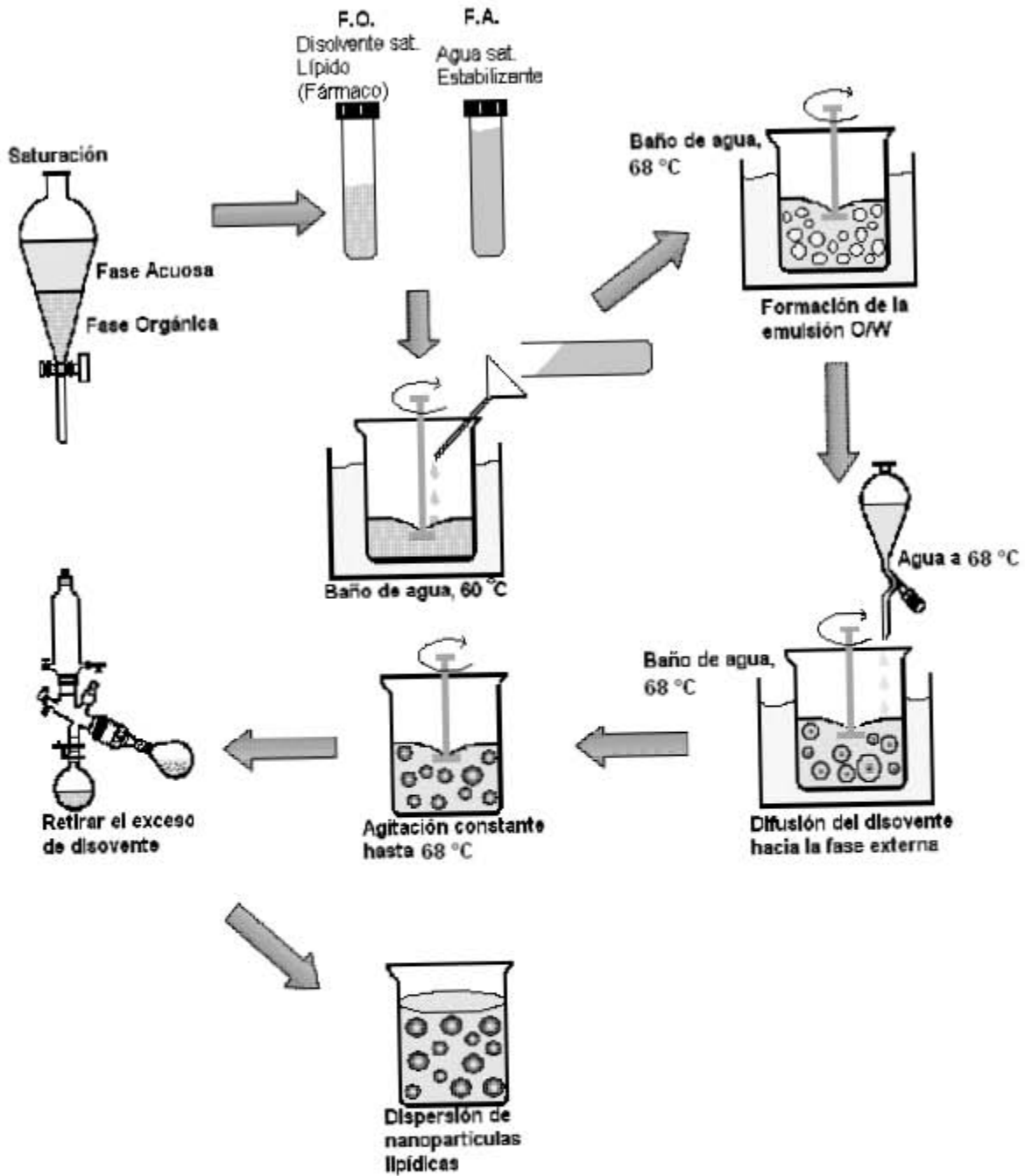


Fig. 13. Método de emulsificación – difusión. Etapas del proceso de elaboración, modificado de [60].

III. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo concierne a la investigación de tecnologías a nivel nanométrico, en donde las dimensiones de las características de investigación son menores que 1/1000 del diámetro de un cabello humano.

La nanotecnología tiene el potencial para cambiar radicalmente el estudio de los mecanismos biológicos básicos, también como para mejorar la prevención, detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades y condiciones médicas adversas. La clave de éste potencial es que la nanotecnología opera en la misma escala que los procesos biológicos, ofreciendo un punto de ventaja completamente único para ver y manipular procesos y rutas biológicas fundamentales [43].

Dentro del área de la nanotecnología se encuentran las nanopartículas para uso terapéutico, éstas son partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 1 – 1000 nm, constituidas de varias macromoléculas en las cuales el fármaco puede encontrarse adsorbido, entrampado o enlazado covalentemente. Una utilidad de las NP's es servir como un nuevo transportador para la liberación de fármacos a través de la circulación hacia los tejidos del cuerpo.

En el cuerpo humano existen regiones altamente protegidas debido a las funciones vitales que desempeñan, cuando estas regiones albergan un padecimiento y localizan el sitio blanco de acción de fármacos para su tratamiento, la estrategia para disponer la cantidad suficiente de moléculas de principio activo en el sitio de acción y en el tiempo necesario consistirá en superar de una manera u otra las barreras biológicas. La barrera hematoencefálica representa una de las barreras más estrictas para la liberación de fármacos *in vivo* en el sistema nervioso central. Esta barrera se caracteriza por un intercambio restringido de compuestos hidrofílicos, proteínas pequeñas, y moléculas cargadas entre el plasma y el SNC; el objetivo biológico es mantener la homeostasis y prevenir al

máximo la entrada de agentes extraños al cerebro, órgano vulnerable e imprescindible en nuestra existencia. La BHE está compuesta de una capa contigua de células endoteliales conectadas por uniones muy estrechas que de forma circunferencial rodean completamente el margen de los capilares del cerebro. De manera aproximada estas uniones endoteliales estrechas (*zonulae occludens*) pueden ser unas 100 veces más estrechas que las uniones de otros endotelios capilares [1-3].

Entre los mecanismos que se han propuesto para superar la BHE se encuentran las nanoesferas lipídicas (también llamadas nanopartículas lipídicas sólidas; *Solid Lipid Nanoparticles*), cuya ventaja principal es su tolerabilidad debido a su composición.

El presente trabajo expone la forma en que se planteó, desarrolló y evaluó una técnica de producción de nanoesferas lipídicas y su potencial uso terapéutico.

IV. HIPÓTESIS

Si se establecen las condiciones óptimas de elaboración del método de emulsificación – difusión y se logra incorporar al clonazepam como fármaco psicoactivo, entonces se obtendrán nanoesferas lipídicas cuya composición matricial podría potenciar el paso del fármaco a través de la barrera hematoencefálica.

V. OBJETIVOS

General

Evaluar la viabilidad de nanoesferas lipídicas como vector de fármacos propuestas para incrementar el transporte de una benzodiazepina hacia el Sistema Nervioso Central mediante su elaboración, caracterización y evaluación *in vivo*.

Particulares

- a) Optimizar el método de emulsificación-difusión a través de la evaluación de los parámetros críticos del proceso de producción para obtener nanoesferas lipídicas de tamaño homogéneo y reproducible.
- b) Encapsular un fármaco modelo de tipo benzodiazepina (Clonazepam) utilizando el método de emulsificación-difusión.
- c) Caracterizar las nanoesferas lipídicas obtenidas determinando el tamaño promedio de partícula, morfología, arreglo cristalino y estabilidad, para analizar el comportamiento del transportador coloidal de fármacos.
- d) Evaluar *in vivo* las nanoesferas lipídicas que contienen clonazepam mediante su administración en ratones blancos (*Mus musculus albinus*) y monitoreo del efecto ansiolítico con el modelo de *Plus Maze* elevado para determinar el potencial uso del transportador submicrónico de tipo lipídico propuesto.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Material de laboratorio y equipos.

- Agitador de velocidad variable (Caframo[®] RZR-1; Canadá)
- Balanza analítica (Boeco[®] BBC 32; Alemania)
- Balanza microanalítica (Mettler[®]; Suiza)
- Baño de agua (Polyscience[®] 5L; E. U. A.)
- Calorímetro diferencial de barrido (TA Instruments[®] DSC Q 10; E. U. A.)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen[®] EBA 12; Alemania)
- Contador submicrónico de partículas (Coulter[®] N4 Plus; E. U. A.)
- Espectrofotómetro UV-Vis (Varian[®] Cary IE 95031003; Australia)
- Liofilizadora de mesa (Labconco[®] FreeZone 6 Liter Bench top; E. U. A.)
- Microscopio electrónico de barrido (JEOL[®] JSM-25SII; Japón)
- pH metro (Corning[®] 430; Inglaterra)
- Parrilla de agitación magnética (Cimarec[®]; Thermoline; E. U. A.)
- Modelo de *Plus Maze* elevado (Farmacología, F. E. S. Cuautitlán C-1 UNAM; México)
- Rotaevaporador (Laborota[®] Heidolph 4000; Alemania)
- Sonicador (Branson[®] Branson 5210; E. U. A.)
- Ultracentrífuga (Beckman[®] Optima LE-80K; E. U. A.)
- Vórtex (Mixer, modelo M16715, E. U. A.)
- Zetasizer and Nanosizer ZEN 3600 (Malvern Instruments[®]; Inglaterra)
- Material de vidrio

Reactivos

- Acetato de etilo (GA, Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Acetona (grado HPLC, Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Ácido acético glacial (grado HPLC, J. T. Baker, E. U. A.)

- Agua destilada (Milli-Q[®], Francia)
- Cloroformo (GA, Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Compritol[®] ATO 888 (Gattefossé Francia, donado por Noveon Inc. México)
- Etanol (grado HPLC, Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metiletilcetona (grado HPLC, Fermont, México)
- Mowiol[®] 4-88 – alcohol polivinílico, masa molecular de 26 000 (Frankfort-am-Main, Alemania)
- Pluronic[®] F127 – Poloxámero 407 (BASF, México)
- Propilenglicol (Conjunto Lar de México, S. A. de C. V.)

Material Biológico

- Ratón blanco (*Mus musculus albinus*) macho, bioterio FES Cuautitlán C-1 UNAM; México

6.2. METODOLOGÍA

La figura 14 muestra de manera general los procedimientos experimentales de esta investigación. La primera etapa consistió en caracterizar los materiales y elaborar nanoesferas lipídicas, la segunda en incorporar el principio activo y finalmente la evaluación *in vivo* del sistema terapéutico propuesto.

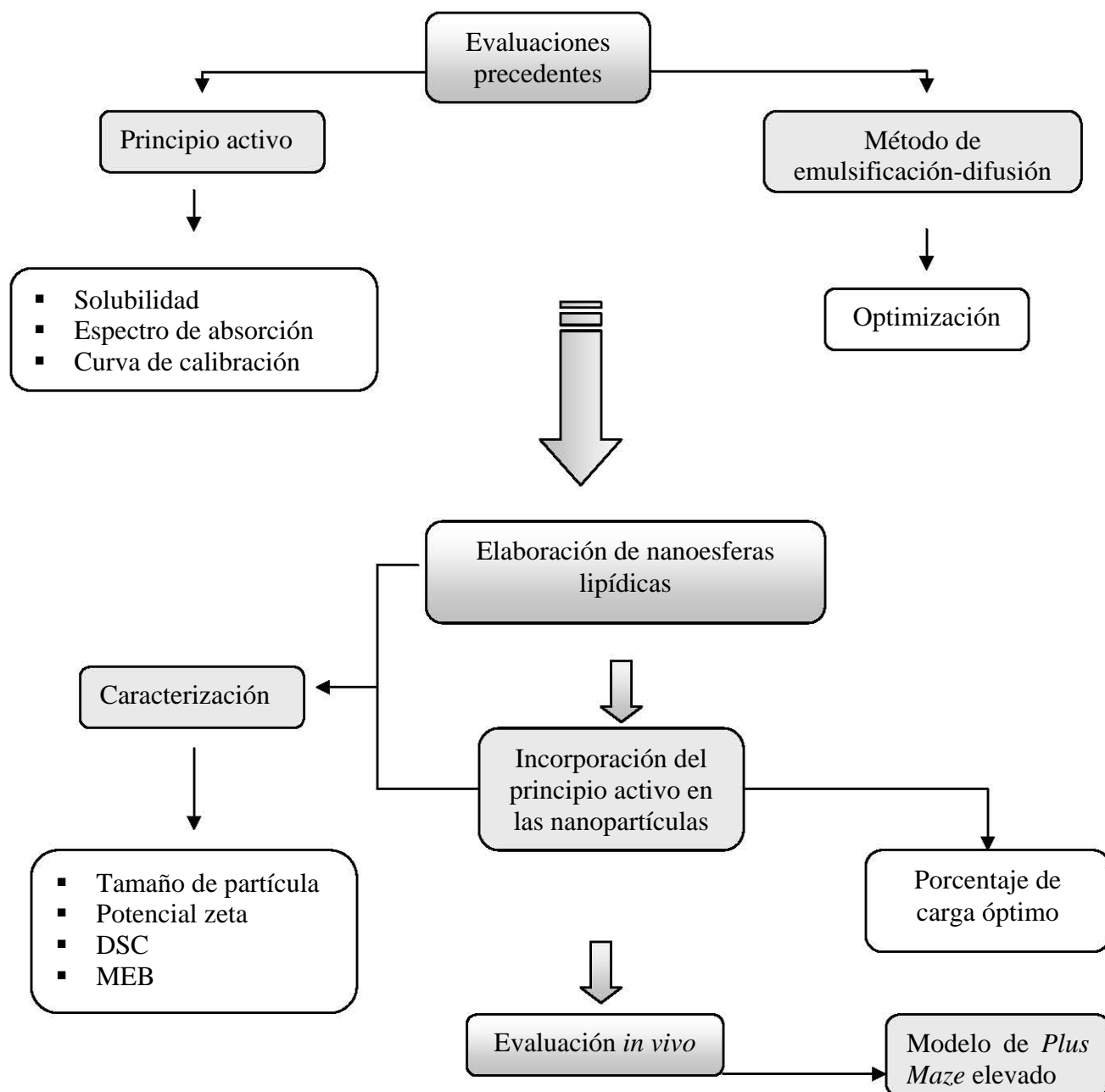


Fig. 14. Procedimientos experimentales llevados a cabo.

6.2.1. Evaluaciones precedentes

6.2.1.1. Principio activo

La revisión bibliográfica sobre el principio activo modelo destinado a ser formulado en acarreadores dirigidos al sitio de acción giró en torno a los siguientes aspectos: 1) baja biodisponibilidad en el sistema nervioso central, 2) alta lipofilicidad, 3) bajo peso molecular y 4) efecto terapéutico de fácil medición.

6.2.1.2. Solubilidad del fármaco

Además de contar con registros previos de solubilidad de clonazepam se determinó la solubilidad en mezclas de solventes orgánicos a diferentes temperaturas para determinar si el principio activo estaría disuelto a las condiciones de elaboración de lotes de nanoesferas lipídicas. También se realizaron pruebas de solubilidad en medios orgánicos en donde se trabajaría el clonazepam en solución para su cuantificación.

6.2.1.3. Espectro de absorción

Se preparó un estándar del principio activo en cloroformo para realizar un barrido por espectrofotometría UV-Visible de 200 – 400 nm, a partir del espectro obtenido se decidió trabajar en la región próxima a 305 nm donde se presenta el segundo máximo de absorción. El primer máximo (250 nm) de absorción fue descartado para evitar las posibles interacciones de absorción (comunes en esta región) con respecto a otras sustancias presentes en diferentes muestras a analizar conteniendo el principio activo.

6.2.1.4. Curva de calibración

La curva de calibración con la cual se trabajo fue a partir del principio activo disuelto en clonazepam, se elaboraron 5 puntos y cada punto se realizo por triplicado. La determinación de la absorbancia de cada sistema se hizo inmediatamente después del aforo.

6.2.1.5. Solubilidad del lípido

La solubilidad del lípido fue evaluada a diferentes temperaturas de la fase orgánica para determinar si el proceso sería a temperatura controlada.

6.2.2. Método de emulsificación – difusión

Para la elaboración de nanoesferas lipídicas se empleó el método de emulsificación – difusión ajustando la temperatura del proceso según la solubilidad de los materiales empleados.

6.2.2.1. Método de emulsificación – difusión a temperatura controlada

El método de emulsificación-difusión a temperatura controlada consiste en lo siguiente: se preparan dos contenedores secundarios; 1) el lípido se encuentra disuelto en un disolvente saturado con agua a una temperatura a la cual solubiliza el lípido, 2) una fase acuosa saturada con el disolvente que contiene un estabilizante y que se encuentra a la misma temperatura que la fase orgánica. El contenido 1) se emulsifica con el contenido 2) en un recipiente principal con agitación mecánica controlando la temperatura con un baño de agua. A ésta emulsión producida se le añade agua destilada a la misma temperatura

conservando la agitación. Después se deja enfriar y se elimina el disolvente por medio de un rotaevaporador (figura 13).

6.2.2.2. Optimización del método de emulsificación-difusión para obtener nanoesferas lipídicas

Se llevó a cabo la optimización del proceso de emulsificación-difusión con el objetivo de encontrar las condiciones adecuadas de elaboración de la dispersión lipídica y también para asegurar la obtención de las características deseadas como tamaño de partícula submicrónico (100-500 nm), población unimodal, formulación estable y factible de separar por ultracentrifugación de los residuos del proceso de elaboración. Se evaluaron las etapas críticas de la técnica de elaboración, las variables de formulación habían sido ya establecidas por nuestro grupo de investigación [93] y lograron satisfacer las especificaciones requeridas.

i) Tipo y velocidad de agitación

Se elaboraron dispersiones lipídicas con tres diferentes tipos de propelas: turbina, hélice marina y tipo centrífuga. Para cada evaluación por tipo de propela se varió la velocidad de agitación de 280 a 2000 rpm.

ii) Temperatura de emulsificación-difusión

Debido a que el Compritol[®] ATO 888 solubiliza en la fase de MEC previamente saturada con agua a 65°C, se prepararon dispersiones lipídicas utilizando las siguientes temperaturas: 60, 62, 64, 66, 68 y 70 °C, para determinar la medida en que puede llegar a afectar un cambio en la temperatura del sistema (trasvase de la fase acuosa con estabilizante hacia la fase orgánica principalmente)

iii) Sistema con contenedor abierto y cerrado

Con la temperatura y agitación del sistema utilizados para elaborar nanoesferas lipídicas se provoca la evaporación de la fase orgánica. Una constante pérdida de la fase orgánica puede producir una difusión obligada del lípido disuelto en ésta hacia la fase acuosa, es un fenómeno de cristalización lento que producirá partículas de tamaño grande, posiblemente no submicrónico. Para evitar en la medida de lo posible la pérdida de la fase orgánica por evaporación se adaptó un tapón de caucho negro, éste constituyó el sistema con contenedor cerrado.

iv) Forma de enfriamiento

Inmediatamente a la obtención de las nanoesferas lipídicas, el sistema tiene una temperatura aproximada de 65 °C y es necesario esperar a que disminuya hasta 30 °C para eliminar el exceso de solvente orgánico y evitar una aglomeración de partículas en el rotaevaporador. Se evaluaron dos maneras de acelerar el enfriamiento mediante agitación: 1) con el agitador de velocidad variable utilizando una propela tipo turbina; 2) agitación magnética

v) Tipo de recipiente principal

Inicialmente el contenedor principal se había elegido únicamente por su capacidad, resistencia y forma adecuada que permitiera la agitación. Sin embargo, había que comprobar si la profundidad de agitación y cambio del efecto vortex afectaban el tamaño y distribución de partícula. De esta manera, se evaluaron dos recipientes de volumen aproximadamente 3 veces mayor al total que ocupa la formulación. Los recipientes fueron un matraz Erlenmeyer de 500 mL y un vaso de vidrio termoresistente (20 cm x 6 cm).

vi) Solvente utilizado

La velocidad de difusión de la fase interna (fase orgánica) hacia la fase externa (fase acuosa) está determinada principalmente por la miscibilidad del solvente orgánico en agua e influenciará directamente sobre el tamaño promedio de partícula (tpp) obtenido. Se evaluaron dos solventes con distinta miscibilidad en agua (diferente coeficiente de partición): acetato de etilo y metiletilcetona, y se determinó el efecto sobre el tpp.

vii) Agente estabilizante

Se realizó la comparación del efecto de dos estabilizantes diferentes: poloxámero 407 y alcohol polivinílico.

viii) Crioprotector

Se utilizó el agente crioprotector trealosa en una concentración de 10 % p/p, fue evaluado el tamaño promedio de partícula con y sin su presencia

Una vez que se optimizó el método para las nanoesferas blanco, las condiciones establecidas se utilizaron de forma fija para elaborar los lotes de nanoesferas lipídicas posteriores que contenían al clonazepam.

6.2.3. Incorporación del principio activo en las nanoesferas lipídicas

El principio activo modelo fue incorporado junto con el lípido en la fase orgánica saturada. Una vez que el contenedor secundario con la fase orgánica saturada había alcanzado una temperatura de 68 °C aproximadamente, se añadió el lípido y se disolvió completamente, posteriormente se añadió el principio activo hasta

completar su disolución, finalmente se procedió con el método general de emulsificación – difusión antes descrito.

6.2.3.1. Determinación del porcentaje de carga óptimo

Los factores que determinan la capacidad de carga del fármaco en el lípido son: 1) solubilidad del fármaco en el lípido fundido, 2) miscibilidad del fármaco fundido y lípido fundido, 3) estructura química y física de la matriz lipídica sólida y 4) estado polimórfico del material lipídico.

El prerrequisito para obtener una suficiente capacidad de carga es una alta solubilidad del fármaco en el lípido fundido. Se sabe que la presencia de mono-, y digliceridos en el lípido utilizado como material para la matriz estructural promueven la solubilización del fármaco [65].

Se determinó cuál es la cantidad máxima de principio activo con la cual se logra tener un sistema estable. La cuantificación del principio activo se realizó por espectrofotometría en lotes de nanoesferas lipídicas que contenían 1, 2, 3, 4, 5 y 6 % p/p (peso del principio activo en relación al peso de la matriz lipídica).

De acuerdo al coeficiente de absortividad del principio activo en cloroformo, se prepararon soluciones a partir del liofilizado de lotes de nanoesferas lipídicas cuya concentración teórica era suficiente para ser detectada por espectrofotometría.

El polvo del liofilizado fue colocado en viales ámbar de 10 mL con cloroformo y se agitó durante 20 minutos para asegurar la completa solubilización del Compritol® ATO 888 y el clonazepam, y dejar en forma insoluble al estabilizante poloxámero 407. Posteriormente está solución se filtró en un filtro de vidrio #2 para retener la parte insoluble. La cuantificación se realizó a una longitud de onda de 305 nm donde se encuentra el segundo máximo del principio activo. Como blanco se utilizó una solución de nanoesferas sin principio activo en cloroformo.

Este procedimiento involucra una degradación del sistema transportador y su solubilización, conforme se va degradando y solubilizando la matriz lipídica, el activo es liberado e igualmente queda soluble.

6.2.4. Caracterización

Para poder explicar el comportamiento de las nanoesferas lipídicas como transportador submicrónico de fármacos es necesario caracterizar a estas partículas en los siguientes aspectos:

6.2.4.1. Morfología

La caracterización morfológica de las nanoesferas lipídicas y la estimación de su tamaño promedio se llevó a cabo con el microscopio electrónico de barrido (MEB).

El MEB es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, se obtiene información morfológica del material analizado en imágenes (micrografías). La principal utilidad del MEB es la alta resolución (100 Å), la gran profundidad de campo que le da la apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras.

El MEB utiliza una fuente con electrones de alta energía que impactan de manera sistemática en forma de barrido la superficie de la muestra. La interacción de los electrones incidentes sobre la muestra produce diversas señales reflejadas que son convertidas a electrónicas y proyectadas a un tubo de rayos catódicos y pasada a un fotomultiplicador, la imagen se transmite a través de una cámara tipo televisión en donde se observa una imagen de la superficie de la muestra con profundidad de campo.

Para poder observar adecuadamente una muestra al microscopio electrónico de barrido, en la mayoría de los casos se requiere hacer un recubrimiento con una

capa fina metálica, ya que son pocos los materiales que tienen una alta capacidad de emisión de electrones secundarios indispensables para la formación de la imagen en el MEB. Con el recubrimiento el contraste de la imagen se mejora y se protege la superficie de la muestra del daño que pueda ocasionarle el impacto del haz de electrones.

El método para la formación de la capa fina metálica consiste en arrancar pequeñas cantidades de átomos de la superficie del metal y depositarlas sobre la muestra (tamaño aproximado de 100 Å). En el caso del recubrimiento por bombardeo iónico, una fuente de energía eléctrica de alta tensión ioniza las moléculas de aire y las hace chocar con gran energía sobre un electrodo metálico.

Este impacto logra arrancar iones del metal, los cuales se dirigen hacia la superficie de la muestra por la presencia de la fuente de alta tensión. Para lograr que el fenómeno se lleve a cabo en forma óptima, el proceso se efectúa en una cámara de vacío de 0.05 torr. Si no existe el vacío suficiente, las moléculas de aire ionizadas chocan entre sí, impidiendo el impacto con el electrodo metálico.

6.2.4.2. Tamaño de partícula

Se utilizó el equipo Nanosizer Coulter[®] N4 Plus que emplea la técnica de dispersión de rayos láser.

El tpp se obtuvo de la dispersión de un haz de luz proveniente de una lámpara He/Ne con una intensidad de 10 mW a una longitud de 678 nm. Las mediciones se realizaron con un detector ubicado a 90° durante 60 seg., y con una temperatura de 25 °C, el medio de dispersión utilizado en todas las mediciones fue agua destilada.

6.2.4.3. Calorimetría Diferencial de Barrido

Mediante un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC Q10 se caracterizó el comportamiento térmico de cada uno de los ingredientes presentes en la formulación. El equipo fue previamente calibrado con un estándar de Indio utilizando un flujo de calor de 10°C/min y con un flujo de nitrógeno de 50 mL/min, y para cada medición se realizó una línea base. Las muestras fueron analizadas de 0 a 300 °C. La calibración, líneas base y mediciones de muestras se llevaron a cabo en celdas de aluminio no herméticas.

6.2.4.4. Potencial zeta

Se utilizó el equipo Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600 que mediante la aplicación de una carga eléctrica genera un fenómeno de movimiento electroforético de las partículas en suspensión, un acoplador registra parámetros del movimiento de las partículas y las correlaciona con un tamaño aproximado.

El fenómeno de movimiento electroforético es descrito de la siguiente manera: El desarrollo de una carga neta en la superficie de la partícula afecta la distribución de los iones en la región interfacial circundante, dando como resultado un incremento en la concentración de iones de carga contraria (a la carga de la partícula) cercana a la superficie. De esta manera se dice que existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula.

La capa líquida circundante de la partícula existe como dos partes:

- 1.- Una región interior denominada capa de Stern, donde los iones están enlazados fuertemente
- 2.- Y una región externa o difusa, donde los iones están menos firmemente enlazados.

En el interior de la capa difusa los iones y partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (P. ej. debido a la gravedad), los iones en la capa fija de Stern también se mueven, pero los iones fuera de éste límite no viajan con la partícula, esta región, en parte de comportamiento independiente se llama límite hidrodinámico o plano de deslizamiento (figura 15).

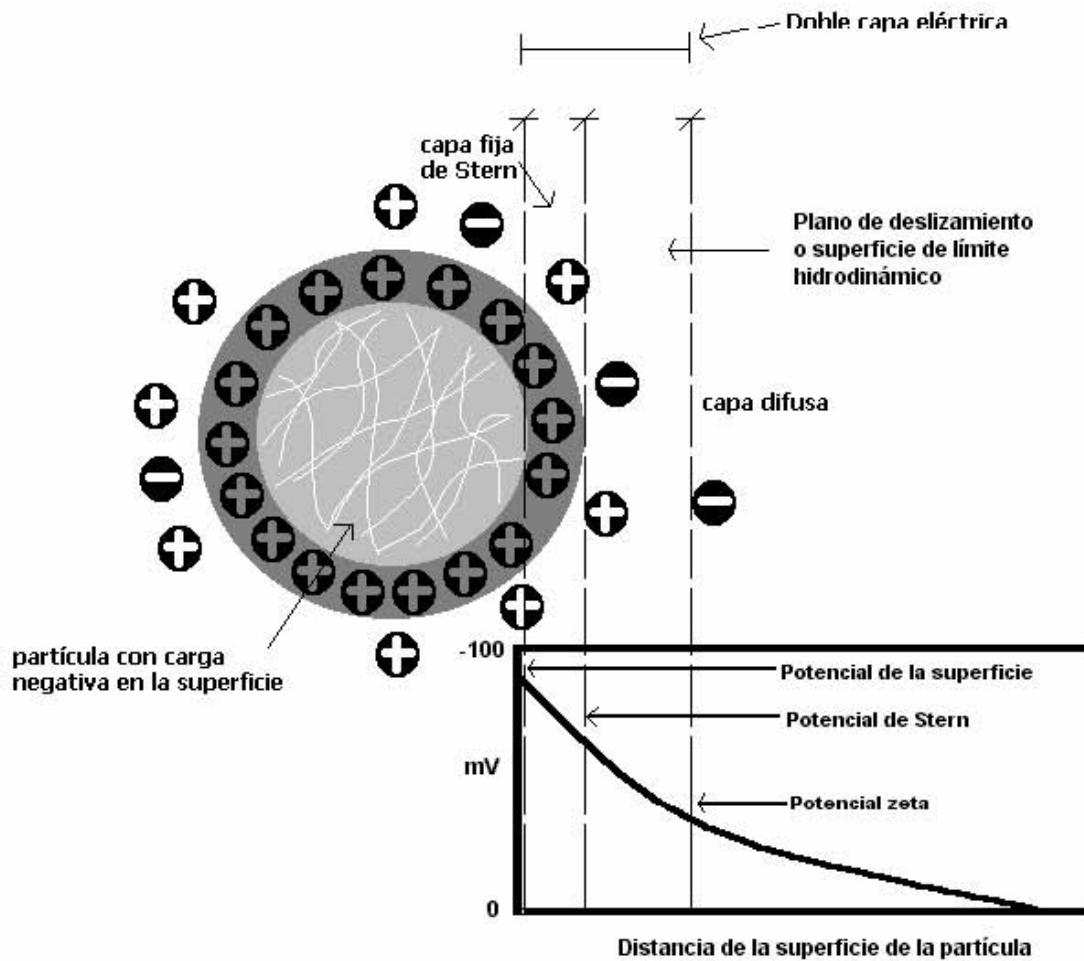


Fig. 15. Fenómeno del potencial zeta, modificado de [96].

El potencial que existe en este límite se conoce como potencial zeta.

La magnitud el potencial zeta proporciona un indicativo de la estabilidad potencial de un sistema coloidal. Un sistema coloidal es cuando uno de los tres estados de la materia: sólido, líquido o gas, está finamente disperso en uno de los otros. Si todas las partículas en suspensión tienen un valor de potencial zeta positivo o negativo alto, habrá repulsión entre las partículas y no existirá una tendencia a flocular. Sin embargo, si las partículas tienen bajos valores de potencial zeta no habrá una fuerza suficiente que prevenga la atracción interparticular y flocularán. El límite general que divide una suspensión estable de una inestable es la consideración de +30mV ó -30mV, partículas con valores de potencial zeta más positivos que +30mV o más negativos que -30mV normalmente se consideran estables.

El potencial zeta de una partícula se obtiene a partir de la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2\xi z f(Ka)}{3\eta} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

z = potencial zeta

U_E = movilidad electroforética

ξ = constante dieléctrica

η = viscosidad

$f(Ka)$ = función de Henry. Se utilizan 2 valores: 1.5 (aproximación de Smoluchowski => medio acuoso, partículas grandes) ó 0 (aproximación de Huckel => medio no acuoso, partículas pequeñas, medio con constante dieléctrica baja).

Determinación de la movilidad electroforética. Se lleva a cabo en un sistema micro-electroforético clásico que consiste de una celda con electrodos en cada

costado terminal a la cual se le aplica un potencial (figura 16). Las partículas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta, la velocidad con la que migran se mide y expresa en unidades de campo de fuerza como su movilidad

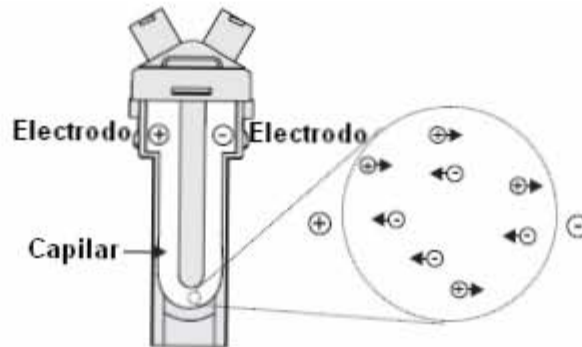


Fig. 16. Celda de capilar doblado para la medición del potencial zeta [96].

6.2.5. Evaluación *in vivo*

La evaluación del efecto ansiolítico se realizó en ratones blancos (*Mus musculus albinus*) mediante el modelo de *Plus Maze* elevado a los 15 minutos después de administrar cada sistema, y con el objetivo de contrastar los resultados a obtener con la administración de las nanoesferas lipídicas conteniendo el fármaco se decidió preparar los siguientes sistemas de referencia: 1) lípido macerado en agua y 2) nanoesferas lipídicas sin fármaco; además de un sistema simple con potencial efecto terapéutico que es la dispersión del principio activo a un pH en donde predomina la forma no ionizada. A continuación se describe cada sistema:

Dispersión de clonazepam a pH 7. El pH 7 corresponde al valor medio entre la diferencia de pKa's y es en donde se encuentra la mayor concentración de la forma no ionizada del clonazepam, en el medio acuoso se establece la mayor insolubilidad. La dispersión del fármaco en agua a un pH de 7 constituye un sistema de comparación en el cual el fármaco ya queda dispuesto en el medio gastrointestinal para tener contacto con las barreras de absorción, es decir,

representa la disposición final del fármaco a partir de una forma farmacéutica convencional (como una tableta) y un sistema simple con potencial efecto terapéutico (esta es la forma a partir de la cual el clonazepam presenta un efecto terapéutico), se comparará con la dispersión de nanoesferas lipídicas conteniendo al fármaco. La dosis terapéutica consistió en 0.1 mg / kg, y se ajustó según el peso correspondiente de cada animal.

Lípido macerado disperso en agua. Esta prueba se realizó para ver el efecto producido del lípido en una forma dispersa en agua diferente a las nanoesferas sin clonazepam, la maceración se llevó a cabo en un mortero con el objetivo de dispersar lo mayor posible al lípido en el agua para administrar dosis homogéneas.

Dispersión de nanoesferas blanco. Este sistema de referencia fue necesario evaluarlo para llevar a cabo una comparación de cualquier efecto producido de las nanoesferas conteniendo al clonazepam y su respectivo sistema blanco de referencia que constituye al acarreador sin fármaco. Se administró la cantidad de nanoesferas lipídicas sin fármaco correspondiente a la cantidad lipídica determinada a administrar para las nanoesferas con clonazepam, se determinó por la diferencia de cantidad de clonazepam entre la formulación de nanoesferas con clonazepam y las nanoesferas blanco, el restante correspondía exclusivamente a la cantidad del acarreador sin fármaco. La determinación de pesos se llevó a cabo sobre el liofilizado de nanoesferas lipídicas, posteriormente se resuspendió en agua con agitación moderada hasta asegurar visualmente la no presencia de aglomerados y medición del tpp.

Dispersión de nanoesferas con clonazepam. Se determinó la cantidad de nanoesferas lipídicas con clonazepam a resuspender y administrar en los ratones de acuerdo con los datos espectroscópicos y la dosis recomendada para producir un efecto ansiolítico.

Además, con la suposición sobre el comportamiento del acarreador lipídico (tolerabilidad e incremento de la absorción), y por experiencias reportadas previamente [97] que plantean el incremento del efecto terapéutico de diversos fármacos encapsulados en sistemas acarreadores semejantes, se propuso evaluar todos los sistemas de referencia y a las nanoesferas conteniendo al clonazepam a una cantidad de fármaco suficiente como para producir un efecto terapéutico y a la mitad de la cantidad de fármaco suficiente para producir un efecto terapéutico, para determinar el grado del efecto producido a ésta última dosis con respecto a la dispersión de clonazepam en agua, es decir, se comprobaría de esta forma, la eficiencia del sistema terapéutico propuesto.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Resultados previos

7.1.1. Principio activo

7.1.2. Elección del principio activo modelo a utilizar

El fármaco que se seleccionó como principio activo modelo fue el clonazepam por los siguientes motivos:

- a) *Biodisponibilidad en el sistema nervioso central*: el clonazepam presenta una biodisponibilidad aproximadamente del 90 %, el objetivo en este aspecto fue mejorar aún más la biodisponibilidad, considerando que los efectos adversos producidos tras la administración en formas farmacéuticas convencionales son la principal desventaja cuando se administra por periodos prolongados.

- b) *Lipofilia*: el clonazepam presenta una alta lipofilia, es prácticamente insoluble en agua (1 en más de 10 000) y tiene un coeficiente octanol/agua de 2.41 (como log de P, se reporta como determinado experimentalmente, y de 2.84 de manera teórica [98]). La característica de lipofilia es necesaria en dos aspectos: 1) la mayor parte de las sustancias que presentan menos problemas para atravesar la barrera hematoencefálica son las sustancias lipofílicas debido a la composición de la barrera; 2) la técnica de producción del acarreador comprende una desestabilización termodinámica que involucra una difusión de la fase orgánica (ó interna), esta difusión que da la formación del acarreador submicrónico simultáneamente atrapa los componentes lipofílicos antes disueltos en la fase orgánica, si el principio activo es hidrofílico se dará la formación del acarreador sin activo atrapado.

- c) *Peso molecular*: el clonazepam presenta un peso molecular bajo en comparación con las sustancias nativas del organismo que atraviesan normalmente la BHE.

- d) *Medición del efecto terapéutico*: la medición del efecto producido por el clonazepam en el organismo se puede determinar de manera cuantitativa, semicuantitativa ó cualitativa, para los propósitos del proyecto planteado fue suficiente una determinación semicuantitativa a través del modelo de *Plus Maze* elevado.

7.1.3. Solubilidad del fármaco

Solubilidad del fármaco para determinar la temperatura del proceso de elaboración del acarreador.

Una propuesta ideal en términos de solubilidad para el proceso de emulsificación – difusión es que la matriz y el fármaco a incorporar sean solubles en la fase orgánica saturada a temperatura ambiente, pues resulta más práctico y rápido el proceso de elaboración. La tabla 7 registra los resultados de solubilidad del fármaco determinado en forma cualitativa.

Tabla 7. Solubilidad de clonazepam en diferentes fases orgánicas de metiletilcetona y acetato de etilo.

Solvente	Metiletilcetona		Acetato de etilo	
	Ambiente ¹⁾	T. Controlada ²⁾	Ambiente ³⁾	T. Controlada ⁴⁾
Fase orgánica pura	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Fase orgánica saturada con H ₂ O	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Fase orgánica saturada con H ₂ O + lípido disuelto	-----	Soluble	-----	Soluble

T. Controlada: temperatura controlada, superior a los 60 °C donde el lípido ya se encontraba disuelto.

- 1) En la fase pura a los 5 segundos de contacto con el disolvente y en la fase saturada aproximadamente a los 30 segundos con agitación moderada.
- 2) En la primera fase al contacto con el disolvente, en el segundo tipo de fase aproximadamente a los 8 segundos y en la última fase aproximadamente a los 10 segundos con agitación moderada.
- 3) En la fase pura a los 5 segundos de contacto con el disolvente y en la fase saturada aproximadamente a los 10 segundos de agitación.
- 4) En la primera y segunda fase al contacto con el disolvente, en la fase que contenía al lípido disuelto el fármaco solubilizó aproximadamente a los 5 segundos.

La solubilidad del principio activo no resultó ser un inconveniente para variar la temperatura del proceso de producción del acarreador lipídico.

Las evaluaciones de la solubilidad del fármaco se realizaron con 20 mL de metiletilcetona y acetato de etilo en tres tipos de fases constitutivas: fase orgánica pura, saturada con agua, y saturada con agua más 200 mg de Compritol® ATO 888 disuelto a la misma temperatura. A manera que la fase orgánica aumenta su constitución disminuye la solubilidad del fármaco, aunque no fue suficiente como para evitar que solubilizara a las condiciones en las que se encontraba soluble el lípido que constituiría la matriz estructural del acarreador.

El resultado meramente confirmatorio es el de la tercera fase constitutiva, puesto que como la cantidad del lípido a solubilizar es mayor a la del fármaco fue necesario establecer que primero se mantendría soluble al lípido y posteriormente al fármaco, así, resultó conveniente saber si la solución orgánica no había sido saturada con la cantidad del lípido disuelto y si podría aún solubilizar al fármaco. En la descripción adjunta a la tabla 7 se puede notar que el lípido previamente disuelto si disminuye la solubilidad del fármaco pero que en la misma solución orgánica se puede mantener solubles a ambos.

Solubilidad del fármaco para determinar el solvente a utilizar durante su cuantificación

La tabla 8 presenta los datos de solubilidad reportados [99] para el clonazepam, y como se puede observar es un claro indicio de su lipofilidad.

Tabla 8. Solubilidad de clonazepam en disolventes orgánicos [99].

Solvente	Solubilidad mg/mL
Etanol absoluto	4.7
Metanol	8.6
Cloroformo	15
Acetona	31
Acetato de etilo	10

De estos datos obtenidos en literatura, el solvente que resultaría más conveniente para solubilizar al fármaco durante su cuantificación sería la acetona, sin embargo, durante las pruebas experimentales se observó una variación significativa en la cantidad del fármaco detectado y cuantificado, esto fue notablemente atribuible a la evaporación de la acetona. En su lugar se eligió

trabajar con cloroformo por tener la mayor solubilidad correspondiente y una menor evaporación que la acetona.

En pruebas experimentales del fármaco en soluciones de cloroformo conservadas a temperatura ambiente y sin protección de la luz se observó una ligera disminución en la concentración de los máximos aproximadamente a los tres días de haber preparado la solución, esta disminución es atribuida a un mecanismo de degradación hidrolítica del activo [100], por este motivo y sin determinarlo de manera exacta y cuantitativa, se tomó la precaución de protección solar en el tratamiento de todos los sistemas que contenían al fármaco.

Para el caso de las benzodiazepinas, también se sabe que sólo el oxazepam y lorazepam que son anfolitos se descomponen por exposición a la luz [10]

Al respecto, se realizaron pruebas cualitativas con lorazepam sin plantear un diseño experimental para determinar la degradación, sino sólo como evaluaciones precedentes a esta sustancia elegida como principio activo modelo alterno, mediante curvas de calibración realizadas en diferentes días a partir de una misma solución estándar se observó una disminución significativa de la pendiente y aún tomando medidas de protección con la solución fue difícil obtener un comportamiento lineal, en los sistemas de mayor concentración se observó una degradación más rápida. Se descartó utilizar lorazepam en este proyecto de investigación.

7.1.4. Solubilidad del lípido

A partir de que el componente lipídico debe estar soluble en la fase orgánica para llevar a cabo el proceso de manufactura, en la tabla 9 se muestra la solubilidad determinada de manera cualitativa en dos fases orgánicas.

Tabla 9. Solubilidad cualitativa del Compritol® ATO 888 en la fase orgánica para el método de emulsificación-difusión.

Solvente	Metil etil cetona		Acetato de etilo	
	T. Ambiente ¹⁾	T. Controlada ²⁾	T. Ambiente ³⁾	T. Controlada ⁴⁾
Fase orgánica saturada con H ₂ O	Insoluble	Soluble	Insoluble	Soluble
	Insoluble	Soluble	Insoluble	Soluble

1) Se evaluó por 5 minutos con agitación.

2) comienza a solubilizar en el rango de temperatura de 65 °C – 67 °C con agitación moderada del recipiente en aproximadamente 3 minutos después de que se introduce un tubo con la muestra en el baño de agua a la temperatura indicada. A 68 °C solubiliza en aproximadamente 1.5 minutos.

3) Se evaluó por 5 minutos con agitación.

4) Comienza a solubilizar en el rango de temperatura de 60 °C – 62 °C con agitación moderada del recipiente en aproximadamente 1 minuto después de que se introduce un tubo con la muestra en el baño de agua a la temperatura indicada. A 63 °C solubiliza en aproximadamente 30 segundos.

A partir de las evaluaciones cualitativas de solubilidad del lípido que constituirá la matriz estructural del acarreador se observa que éste constituyente solubiliza en metiletilcetona a partir de 65 °C y en acetato de etilo a partir de 60 °C, como consecuente, el proceso de elaboración tendría que ser a una temperatura superior (aproximadamente + 3 °C) para contrarrestar las posibles variaciones en la temperatura del baño de agua (debido a un cambio en la temperatura ambiente, que es común cuando el baño de agua tiene temperaturas altas, la diferencia de temperaturas es mayor).

El barrido del espectro de absorción realizado al Compritol® ATO 888 en una longitud de onda de 200 - 400 nm muestra una mínima absorción cercana a los 200 nm y desaparece por completo en aproximadamente 220 – 230 nm, por lo que no provoca interferencia alguna en la detección y cuantificación del clonazepam. El poloxámero 407 no presenta ninguna interferencia en esta longitud de onda.

7.2. Método de emulsificación – difusión

Para la elaboración de nanoesferas lipídicas se necesita un lípido sólido, un estabilizante, solvente orgánico y agua.

Se eligió el Compritol[®] ATO 888 como mezcla de lípidos (ácidos grasos de origen vegetal), Pluronic F-127[®] como estabilizante (estérico), metiletilcetona como fase orgánica y agua, teniendo en cuenta que estos ingredientes producen un sistema estable, con tamaño submicrónico [93].

El acetato de etilo y la metiletilcetona (2-butanona) son solventes parcialmente miscibles en agua, reconocidos por su baja toxicidad (anexo 5), buenas propiedades para solubilizar y bajo punto de ebullición (fácil de eliminar). El alcohol polivinílico y poloxámero 407 (Pluronic F-127[®]) se seleccionaron para mantener estable la dispersión final debido a su solubilidad en agua, ingestión tolerable y buena compatibilidad con el organismo.

7.2.1. Método de emulsificación – difusión a temperatura controlada

El método general mediante ésta técnica a temperatura controlada consistió en lo siguiente (figura 13): se prepararon dos contenedores secundarios; 1) 200 mg de Compritol[®] ATO 888 disueltos en 20 mL de disolvente saturado (metiletilcetona) con agua a 68 °C, 2) 40 mL de una fase acuosa saturada con el disolvente que contiene Pluronic F-127[®] (5% p/v) y que se encontraba a la misma temperatura que la fase orgánica (68 °C). El contenido 1) se emulsificó con el contenido 2) en un recipiente principal con un agitador de velocidad variable por un periodo de 10 minutos controlando la temperatura con un baño de agua. A esta emulsión producida se le añadieron 160 mL de agua destilada a 68 °C conservando la agitación por 10 minutos. Después se dejó enfriar hasta 30 °C bajo agitación. Por

último se eliminó el disolvente por medio de un rotaevaporador hasta que el volumen del sistema era de 100 mL aproximadamente.

Para el mecanismo de formación del acarreador lipídico mediante el método de emulsificación – difusión se sugiere (figura 17) que la difusión del disolvente de los glóbulos de la emulsión acarrea moléculas hacia la fase acuosa formando regiones locales de sobresaturación de las cuales se forman nuevos glóbulos o agregados del lípido (no totalmente desolvatados).

La estabilización de estas “proto-nanopartículas” por la presencia del agente estabilizante es importante para evitar su coalescencia y con ello la formación de aglomerados. De esta manera, si el agente estabilizante permanece en la interfase líquido – líquido durante el proceso de difusión y si su efecto de protección es adecuado, entonces, la difusión del disolvente resultará en la formación de nanoesferas [60].

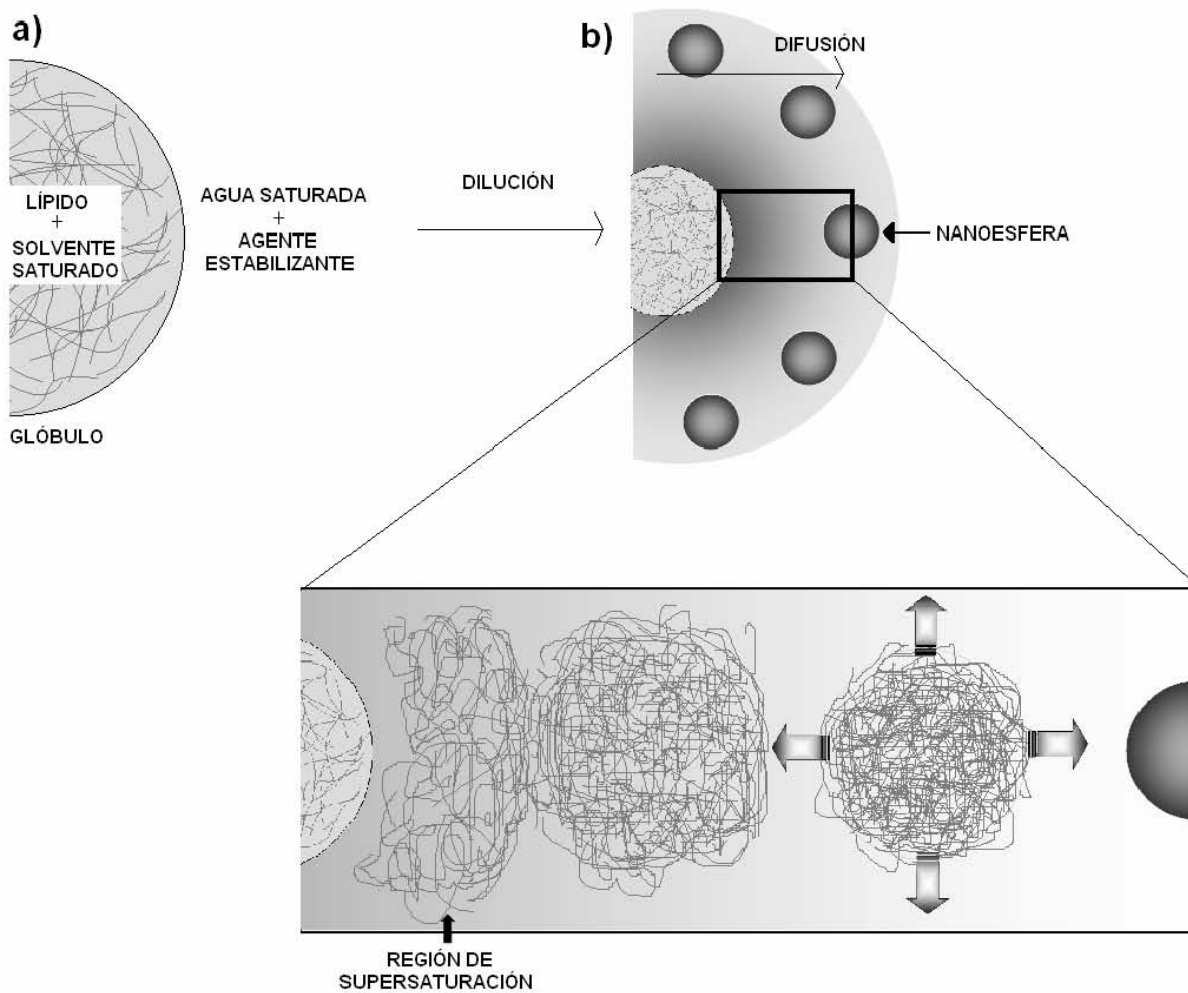


Fig. 17. Mecanismo propuesto para la formación de las nanoesferas lipídicas a través del método de emulsificación – difusión, modificado de [60].

7.2.2. Optimización del método

a) Tipo de agitación

Por el tipo de propelas para agitación variable empleadas (figura 18) la disminución en el tamaño promedio de partícula a una velocidad de agitación de 1240 rpm se dio cuando la propela genera un mayor corte para el rompimiento de los agregados de lípido recién formados después de la difusión.



Fig. 18. Propelas utilizadas del agitador de velocidad variable, de izquierda a derecha: varilla con turbo hélice PR 31 (o de doble cono truncado), de dos paletas y varilla con doble pala basculante BR 14 [101, 102].

A pesar de que se contaba con información previa del grado de corte de algunas propelas para este tipo de sustancias, la determinación del tamaño de las “proto-nanopartículas” formadas dependen también en gran medida del agente estabilizante, y en este caso éste ingrediente es diferente por lo que resultaba necesario determinar cómo era el grado de variación en el tamaño promedio de partícula utilizando diferentes tipos de propela y el rango de tamaño obtenido

Como se puede observar en la figura 19, con las propelas empleadas se logra obtener tamaños submicrónicos y aún, menores de 500 nm (especificación

máxima de tamaño necesaria para que el acarreador pueda atravesar la mayor parte de las barreras biológicas), en base a estos resultados se determinó el tipo de propela a utilizar en las preparaciones posteriores del acarreador lipídico, que dependió de: habilidad de ser incorporada en recipientes estrechos con boca cerrada para disminuir la evaporación de la fase orgánica, y que a bajas velocidades de agitación se lograra obtener un tamaño próximo al rango de 200-300 nm (para facilitar el paso en la barrera hematoencefálica y mejorar el proceso de separación de residuos de solvente y estabilizante), la propela de doble pala basculante genera un alto corte que a bajas velocidades permite obtener tamaños por debajo del rango deseado, dificultando el proceso de eliminación de residuos y no se adapta fácilmente a recipientes estrechos, por otra parte la propela tipo turbo hélice tiene el inconveniente de tener un bajo corte y produce tamaños de partícula próximos al límite máximo, por el contrario, la propela de dos paletas es la que produce un tamaño deseado a una velocidad moderada y se adapta fácilmente a cualquier recipiente estrecho (para lograr una profundidad adecuada de agitación y evitar al máximo la evaporación de la fase orgánica).

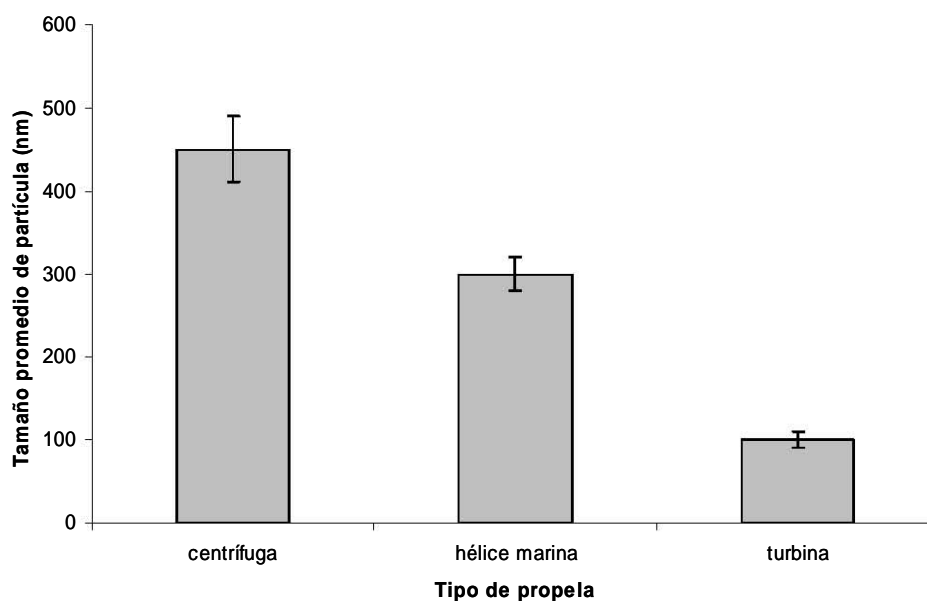


Fig. 19. Efecto en el tamaño promedio de partícula por el tipo de agitación (\pm D. E.).

b) Velocidad de agitación

Por lo que se refiere a la velocidad de agitación (figura 20), una vez que se determinó la propela adecuada para producir el acarreador lipídico del tamaño deseado, fue conveniente determinar el efecto de la velocidad de agitación sobre el tpp. Considerando que en la evaluación del tipo de propela se obtuvo un tamaño de partícula adecuado, cabía la posibilidad de que a menores velocidades de agitación se obtuviera un tamaño muy cercano al pretendido, ó por otra parte, que a mayor velocidad de agitación se obtuviera un tamaño de partícula que estuviera en el centro del rango de tamaño deseado. Además de que la primera suposición se reforzaba en el sentido de que éste tipo de procesos son más fácilmente escalables a nivel industrial en la medida en que se utilice bajas velocidades de agitación, en grandes contenedores es difícil lograr velocidades altas.

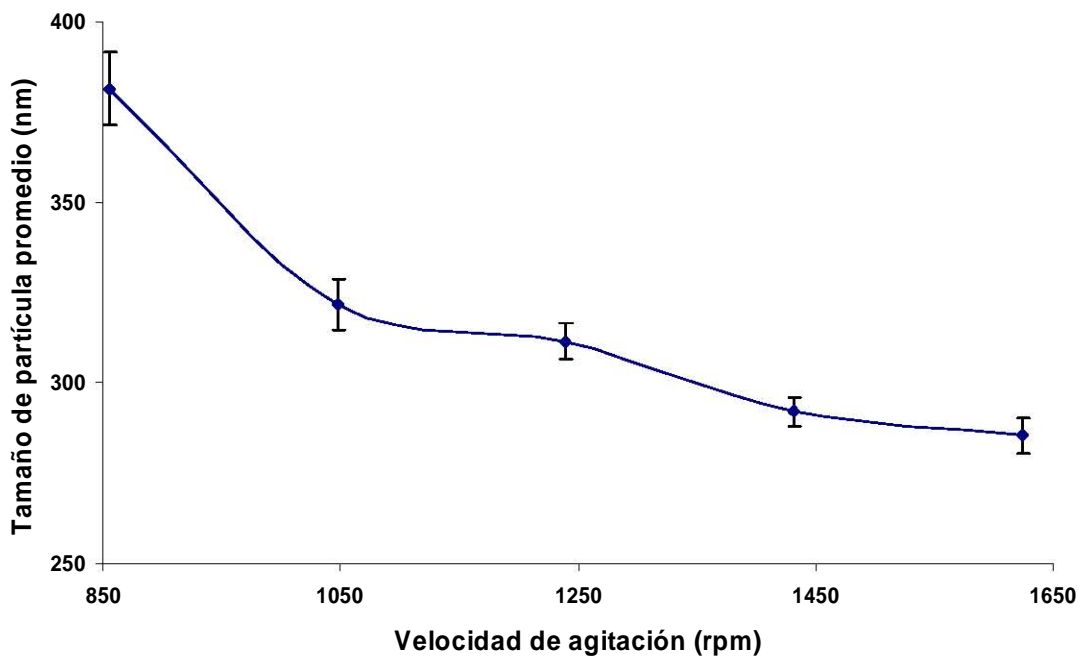


Fig. 20. Efecto en el tamaño promedio de partícula por la velocidad de agitación (\pm D. E.).

La figura 20 muestra que una disminución en la velocidad de agitación aumenta considerablemente el tamaño de partícula y por el contrario, un aumento en la velocidad de agitación no disminuye en un grado deseado (aproximadamente en 250 nm) el tamaño de partícula, razón por la cual se eligió trabajar en las preparaciones posteriores con una velocidad de agitación de 1240 rpm.

c) Temperatura de emulsificación-difusión

Hay que tener en cuenta que la temperatura del proceso de emulsificación – difusión es una condición importante desde que determina la solubilidad del ingrediente lipídico que constituirá la estructura del acarreador y en que se tiene que mantener constante por aproximadamente 20 minutos la temperatura de los contenedores que se encuentran sumergidos en el baño de agua. De modo que se planteó determinar el efecto de la variación de la temperatura del baño de agua sobre el tamaño promedio de partícula, los resultados son mostrados en la figura 21.

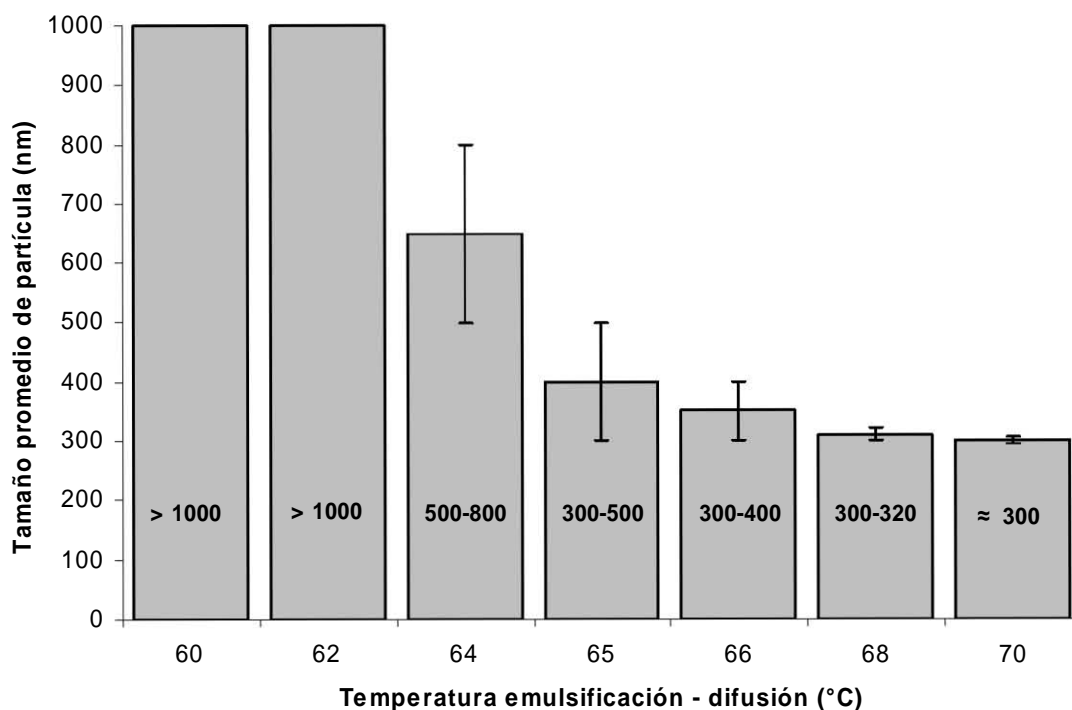


Fig. 21. Efecto en el tamaño promedio de partícula por la temperatura del proceso (\pm D. E.).

La figura 21 muestra que a partir de una temperatura de 64 °C se obtienen partículas submicrónicas y que además conforme incrementa la temperatura disminuye la amplitud de distribución de tamaño de partícula obtenido, acercándose al fijado en los experimentos previos. Si se trabajara con temperaturas de 60 – 62 °C no se obtienen tamaños submicrónicos; a 64 °C se obtienen tamaños submicrónicos pero con una mínima variación en la temperatura no se obtendrá este tipo de partículas; a 65 °C que pudiese ser la temperatura óptima y que es además en donde se determinó que solubiliza el lípido, se obtienen tamaños de partícula submicrónicos pero con un amplio rango en tamaño que se puede deber a una transición insoluble – soluble por la temperatura. De 66 – 68 °C el rango de tamaño de partícula empieza a disminuir acercándose a 300 nm, hasta que en 70 °C la distribución resulta ser la más ajustada. Asimismo, durante estas determinaciones se observó que a 65 °C existen variaciones en la temperatura de hasta ± 3 °C, en otras palabras esto significa que a 65 °C no se asegura completamente obtener partículas con un rango de tamaño de 300 – 500 nm, sino que incluso no se puede llegar a obtener partículas submicrónicas (si el lípido se encuentra en temperaturas menores a la que solubiliza precipita antes de lo requerido por el proceso, y forma partículas de mayor tamaño), y este comportamiento resulta natural debido a que a altas temperaturas es más difícil mantener una temperatura constante por la diferencia amplia entre la temperatura del baño de agua y la ambiental, la búsqueda de un equilibrio térmico se observa notoriamente, e incluso este fenómeno se puede atenuar cuando la temperatura controlada es mantenida únicamente por el baño de agua y en épocas del año cuando la temperatura ambiental disminuye aún más. En definitiva, se eligió trabajar con una temperatura controlada de 68 °C aproximadamente, tratando de suplir las posibles variaciones de temperatura.

d) Sistema con contenedor abierto y cerrado

La evaluación del efecto del contenedor abierto y cerrado sobre el tamaño promedio de partícula (figura 22) a través de la prueba de ANADEVA con un nivel

de confianza del 95 % muestra que no existe variación (figura 23) significativa en el tamaño promedio de partícula del acarreador lipídico elaborado en un contenedor cerrado y en uno abierto. Las pruebas se realizaron a 68 °C y una velocidad de 2200 rpm, con la propela tipo hélice marina. Se realizó a la mayor velocidad de agitación suponiendo que en estas condiciones se daría la máxima evaporación de la fase orgánica debida a la agitación (además de la producida por la temperatura).

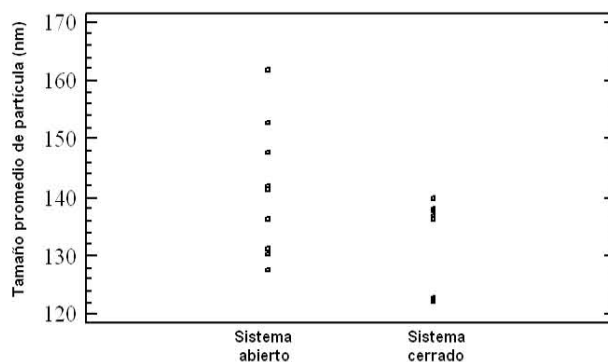


Fig. 22. Efecto en el tamaño promedio de partícula por la evaporación de la fase orgánica durante el proceso de elaboración.

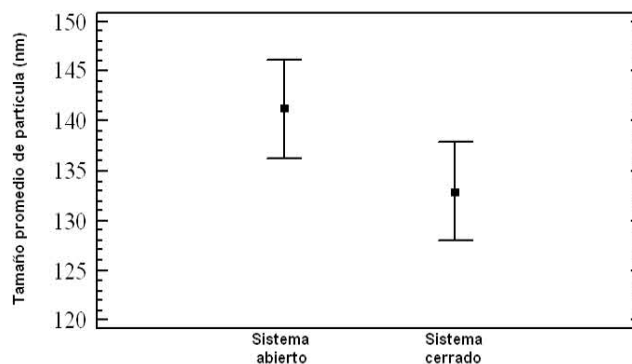


Fig. 23. Tamaño promedio de partícula y límites de desviación estándar al 95 %.

La figura 23 también muestra que no existe una variación importante en la comparación de ambos sistemas, sin embargo, se puede notar que las partículas producidas en el contenedor abierto tienen una distribución en tamaño amplia, y por el contrario, las partículas producidas en el contenedor cerrado tienen una distribución en tamaño ajustada.

Esta variación producida puede ser explicada por la cantidad y velocidad de evaporación de la fase orgánica antes del proceso de difusión: la constante pérdida de la fase orgánica producida en gran medida por la temperatura y también por la agitación puede provocar una difusión obligada del lípido disuelto en ésta hacia la fase acuosa, es un fenómeno de cristalización lento que producirá partículas de tamaño grande, posiblemente no submicrónico.

A mayor velocidad de agitación y temperaturas altas se evaporará rápidamente y en mayor cantidad la fase orgánica, en el caso contrario posiblemente la pérdida constante y lenta no afectará de manera importante al proceso de emulsificación, aunque sí puede producir partículas que cristalicen antes de la difusión con tamaños ligeramente diferentes a las producidas únicamente al proceso de emulsificación – difusión, el resultado final para esta segunda suposición es una distribución de tamaño no completamente ajustada. Siendo este el caso, y relacionándolo con los resultados obtenidos se puede suponer una velocidad y cantidad de evaporación de la fase orgánica no suficiente (rápida y en alta cantidad) como para desplazar significativamente el tamaño promedio de partícula obtenido en estas condiciones con respecto al obtenido cuando se toma la precaución de evitar en la medida de lo posible la evaporación de la fase orgánica.

Tomando en cuenta exclusivamente el resultado estadístico de no haber variación significativa en el tamaño promedio de partícula obtenido en ambos recipientes, se eligió realizar el proceso de emulsificación - difusión en un contenedor abierto.

e) Forma de enfriamiento

Esta evaluación se llevó a cabo para determinar si existía una influencia en el tipo de agitación después del proceso de emulsificación – difusión (figura 24) para acelerar el enfriamiento del sistema y posteriormente proceder a eliminar por presión reducida en un rotaevaporador el solvente orgánico residual.

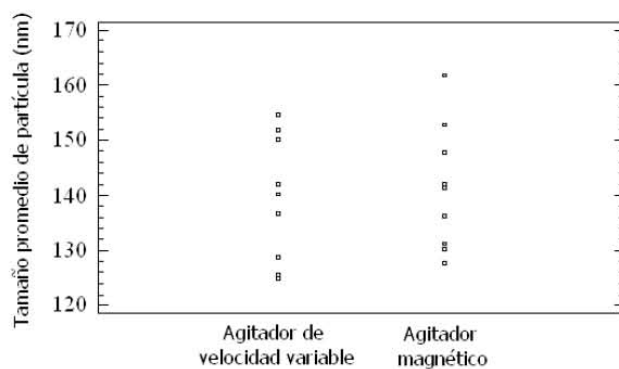


Fig. 24. Efecto en el tamaño promedio de partícula por la forma de enfriamiento después del proceso de elaboración.

Por la prueba de ANADEVIA con un nivel de confianza del 95 % se obtuvo que no existe variación (figura 25) significativa en el tamaño promedio de partícula del acarreador lipídico elaborado en un sistema que se enfría mediante agitación magnética y en un agitador de velocidad variable con una propela tipo hélice marina.

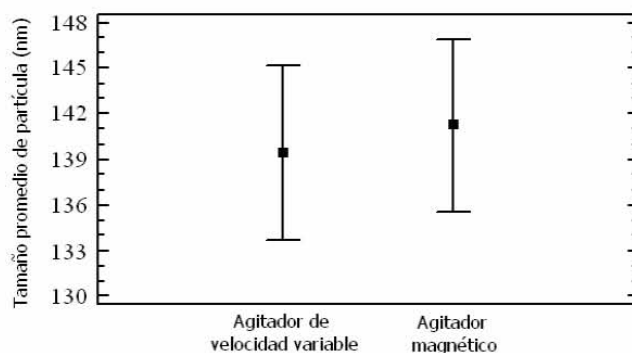


Fig. 25. Tamaño promedio de partícula y límites de desviación estándar al 95 %.

Estos resultados son congruentes con la suposición de que en esta etapa el acarreador lipídico ha sido formado en un tamaño y constitución estructural definitiva.

Como no existe variación en ambas formas de enfriamiento, se eligió enfriar los lotes producidos mediante agitación magnética que experimentalmente es la forma más práctica. No se logró reducir en gran medida el tiempo de espera de enfriamiento del sistema, pero parece ser el más conveniente por la poca energía empleada y el bajo impacto mecánico de agitación, junto con la ayuda de un extractor de aire.

f) Tipo de recipiente principal

Las consideraciones más relevantes en la elección del contenedor principal para elaborar el acarreador lipídico fueron las siguientes: resistencia a altas temperaturas y estrecho en la medida que permitiera adecuada profundidad de agitación y que cupiera la propela. Se evaluó la consideración sobre la profundidad de agitación (figura 26) mediante la elaboración del acarreador lipídico en un recipiente que permitía una baja profundidad de agitación (16 cm x 10 cm, profundidad media de 2.5 cm) y en otro donde se lograba una mayor profundidad de agitación (20 cm x 6 cm, profundidad media de 5 cm).

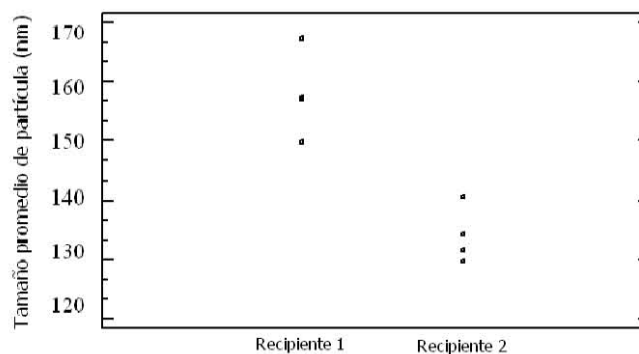


Fig. 26. Efecto en el tamaño promedio de partícula por el tipo de recipiente principal en que se llevó a cabo el proceso de elaboración.

Por la prueba de ANADEVIA con un intervalo de confianza del 95 % se obtuvo que si existe diferencia (figura 27) significativa entre el tamaño promedio de partícula del acarreador lipídico elaborado en un recipiente con baja profundidad de agitación y entre otro recipiente que permite mayor profundidad de agitación.

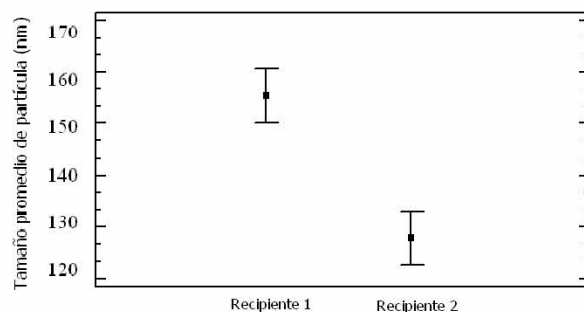


Fig. 27. Tamaño promedio de partícula y límites de desviación estándar al 95 %.

Se puede decir que el tamaño promedio de partícula y su amplitud de distribución de tamaño es menor cuando se permite mayor profundidad de agitación, esto se puede deber a que en el recipiente más angosto (y que por lo tanto permite mayor profundidad) el corte de agitación producido por la propela es más homogéneo y constante. En el recipiente de menor profundidad de agitación el corte de agitación no es homogéneo ni constante en todo el sistema debido a que disminuyen con un aumento en el radio de agitación y precisamente como el diámetro del sistema es mayor, el radio de agitación es menor y las regiones externas no tienen la misma agitación que las partículas que están en contacto directo con la propela.

De acuerdo a este análisis, se eligió elaborar el acarreador lipídico utilizando como contenedor principal el recipiente de dimensiones 20 cm x 6 cm que permite mayor profundidad de agitación.

g) Solvente utilizado

Por lo que se refiere al solvente utilizado, el experimentó que se planteó giro entorno al efecto final producido en el tamaño promedio de partícula del acarreador lipídico debido exclusivamente a un cambio en la miscibilidad de la fase orgánica (tabla 10). Los solventes utilizados fueron metiletilcetona y acetato de etilo, que ya habían sido ampliamente utilizados para producir acarreadores lipídicos de composición semejante [93].

Tabla 10. Tamaño promedio de partícula de nanoesferas lipídicas obtenidas en solventes con diferente coeficiente de partición.

Solvente	Metiletilcetona	Acetato de etilo
Tamaño	105 ± 15 nm	587 ± 12 nm
Log (o/w)	0.26	0.73

A una velocidad de agitación de 1624 rpm utilizando la metiletilcetona que en este caso es el solvente con el valor más bajo de log o/w, es decir, más miscible en agua se obtienen tamaños de partícula más bajos que con el acetato de etilo, que es menos miscible en agua. Ésta discrepancia puede ser atribuida a la diferente cristalización (precipitación) del lípido en el solvente (dado por la velocidad de difusión), en acetato de etilo difunde más lento y por tanto cristaliza más lento produciendo partículas más grandes, en metiletilcetona la agregación es inmediata por una difusión rápida.

Por consiguiente y con el objetivo de mantener tamaños menores a 500 nm se decidió trabajar con el solvente orgánico metiletilcetona (con el cual además ya se habían determinado experiencias anteriores). Si fuera necesario utilizar el solvente

acetato de etilo se tendría que aplicar mayor velocidad de agitación para reducir el tamaño de partícula y optimizar las etapas críticas discutidas anteriormente.

h) **Agente estabilizante**

La evaluación del efecto de dos estabilizantes diferentes que actúan por el mismo mecanismo de protección estérico (impedimento de unión de partículas por rebote entre espirales del agente estabilizante adsorbido en la superficie del acarreador lipídico) se llevó a cabo para evaluar el grado de influencia en el tamaño promedio de partícula final del acarreador lipídico (tabla 11).

Se utilizó el poloxámero 407 y el alcohol polivinílico a una velocidad de agitación de 1240 rpm y con metiletilcetona como fase orgánica.

Tabla 11. Tamaño promedio de partícula de nanoesferas lipídicas obtenidas con diferente agente estabilizante.

Estabilizante	Poloxámero 407	Alcohol polivinílico
Tamaño	310 ± 10 nm	825 ± 50 nm
Agregados	-	++
Apariencia coloidal	Si	No

La habilidad para mantener el tamaño original de la proto-nanopartícula que dará origen a la nanoesferas (nanopartícula, acarreador lipídico) y su estabilidad están determinados por la habilidad de disposición del agente estabilizante en la interfase líquido – líquido (figura 28) y de adsorción sobre la superficie de la matriz lipídica (figura 29).

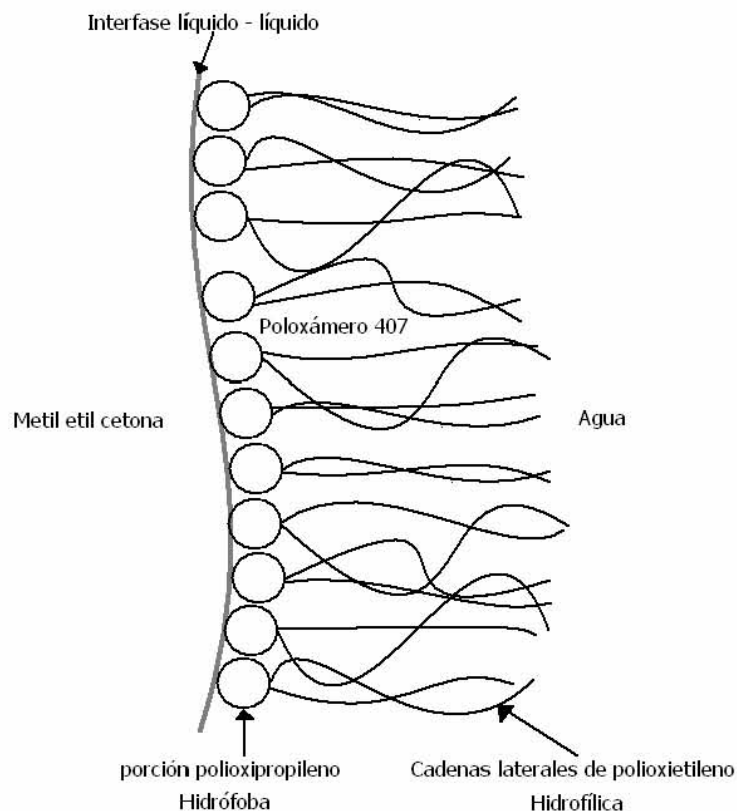


Fig. 28. Representación de la disposición de las moléculas de poloxámero 407 en una interfase sustancia acuosa – sustancia orgánica, modificado de [103].

En esta evaluación se encontró (tabla 11) que el alcohol polivinílico tiene un menor efecto protector para mantener de un tamaño adecuado y estable al acarreador lipídico, mientras que con el poloxámero 407 se logró obtener a las mismas condiciones de preparación partículas de menor tamaño, con un rango de distribución en tamaño estrecho y además estable.

La estabilización estérica del poloxámero 407 se refiere a la prevención de la floculación de las partículas coloidales (acarreador lipídico) por la adsorción de moléculas de polímero no iónico (figura 29). La estabilización estérica debe ser

distinguida de la “protección” porque en la primera hay ausencia de cualquier componente electrostático.

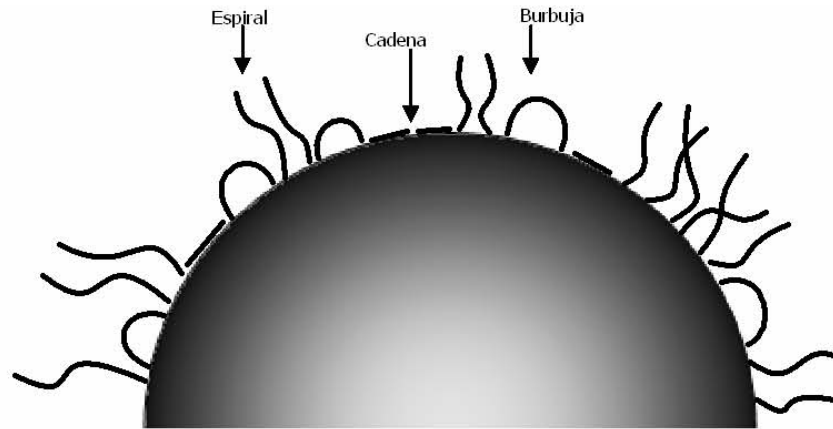


Fig. 29. Formas de adsorción del poloxámero 407 sobre partículas coloidales, modificado de [103].

La estabilización se atribuye a la adsorción del polímero en forma de espirales, burbujas y cadenas, sobre la superficie (figura 30), previniendo estéricamente a las partículas de estar lo suficientemente cerca por las fuerzas atractivas de London-Van der Waals y así llegar a la floculación. La acción estabilizante de la parte saliente del polímero (polioxi-etileno) es extremadamente eficiente)

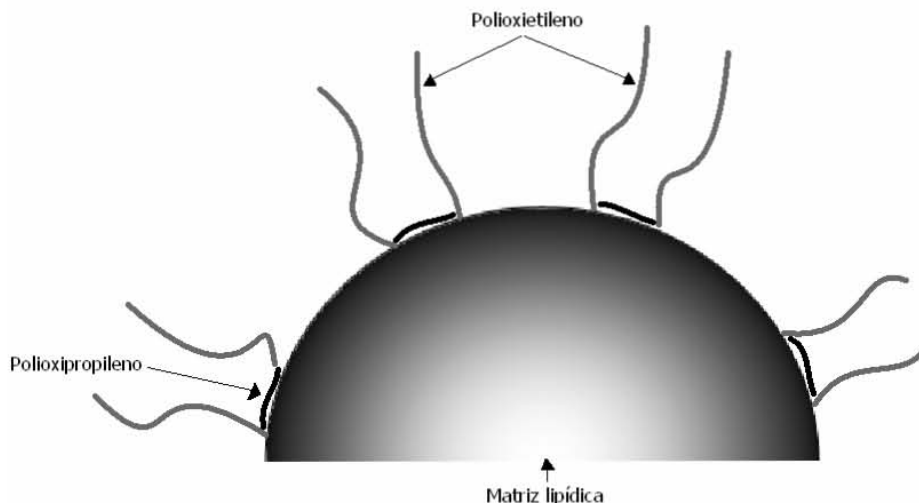


Fig. 30. Forma de adsorción del poloxámero 407 sobre partículas coloidales para explicar el mecanismo común de estabilización, modificado de [103].

La disposición preferencial para la estabilización del poloxámero 407 es la adsorción de la porción de polioxipropileno a la matriz lipídica en cadenas y las porciones de polioxietileno quedan disponibles para repulsión estérica en forma de espirales o burbujas [103].

En este caso también se puede observar que haciendo una comparación de la concentración de agente estabilizante residual antes reportado (poloxámero 407 de 0.84 – 3.98 % p/p y para el alcohol polivinílico de 6.1 – 8.1 % p/p [89]) para nanopartículas poliméricas (estabilizante restante, adsorbido en la partícula), resulta ser que el agente estabilizante que ha sido cuantificado en menor concentración tiene un mayor efecto protector que el que se encuentra en mayor concentración. Esto indica que el efecto protector depende principalmente de la habilidad de disposición del estabilizante en la interfase y de su adsorción sobre la matriz lipídica. El hecho de que en esta investigación se demuestre un mayor efecto del poloxámero 407 en base a resultados de tamaño y estabilidad, en comparación con resultados previos obtenidos de la evaluación en nanopartículas poliméricas es probablemente a que la porción de polioxipropileno presenta mayor

afinidad por compatibilidad de hidrofobicidad con la matriz lipídica del Compritol® ATO 888 [91].

i) Agente crioprotector

En datos de literatura [104] se reportaba la utilización de trealosa en una concentración de 2.5 – 15 % (p/v) como agente crioprotector para nanoesferas de Compritol® ATO 888 estabilizadas con un agente diferente (que disminuye la tensión superficial) al poloxámero 407.

En la evaluación del tamaño promedio de partícula realizada con el agente crioprotector trealosa al 10 % (p/v) y sin crioprotector después de liofilizar (la muestra se congeló a -20 °C, liofilización 0.055 Mbar y – 46 °C del colector, 48 hrs), no se observa una diferencia importante en el aumento del tamaño cuando no se agrega un agente crioprotector (tabla 12).

Tabla 12. Tamaño promedio de partícula de nanoesferas lipídicas obtenidas después de liofilizar con y sin agente crioprotector.

Evaluación	Sin trealosa	Con trealosa al 10 %
Tamaño	330 ± 20 nm	310 ± 5 mn
Agregados	-	-
Apariencia coloidal	Si	Si

Además, se observó que la muestra liofilizada sin el crioprotector resuspende relativamente fácil (agitación magnética, 10 -20 minutos) para obtener un tamaño semejante al original. Para el caso de los poloxámeros se ha reportado un posible mecanismo de desestabilización de las nanopartículas durante el proceso de

liofilización debido a la solubilización del poloxámero en la etapa de enfriamiento, la solubilidad de los poloxámeros es mayor en frío que en caliente debido a la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas del agua y los numerosos grupos éter de los poloxámeros. Por tanto, una disminución en la temperatura favorece la solvatación del poloxámero que puede romper la adsorción con la nanopartícula y migrar hacia el medio aún en solución (antes de congelar). De acuerdo con la apariencia física y el tamaño registrado es posible que este mecanismo se haya presentado en un menor grado, si el efecto de solvatación y migración del poloxámero hubiera sido mayor, la estabilización hubiera disminuido y el tamaño registrado sería mayor.

El efecto crioprotector de los azúcares (figura 31) como la trealosa es explicado por la formación de una matriz amorfa que preserva la suspensión [91].

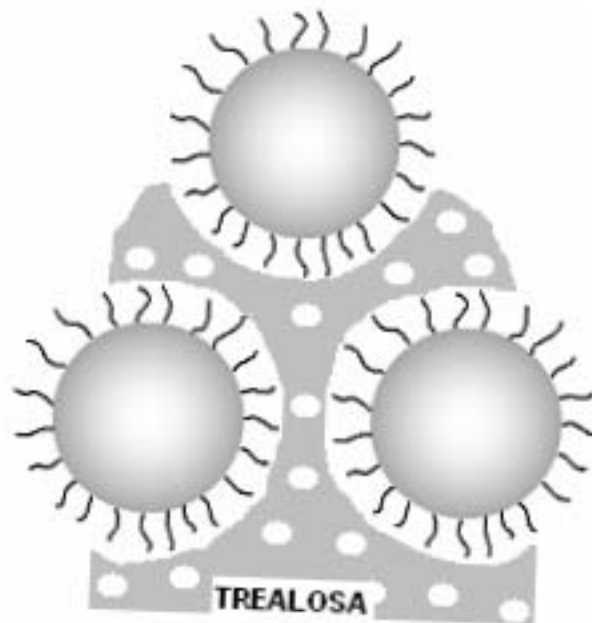


Fig. 31. Representación esquemática del mecanismo de crioprotección de los azúcares, modificado de [91].

7.3. Estabilidad de las nanoesferas lipídicas sin clonazepam (blanco)

7.3.1. Tamaño promedio de partícula

En la evaluación del tamaño de partícula realizada a lotes del acarreador lipídico hasta por casi un año después de su preparación se observa (figura 32) un incremento en el tamaño de 53 nm, aunque no es considerable como para clasificarlo como un sistema inestable. Aproximadamente 20 días después de su preparación se observó un ligero precipitado que es atribuido a partículas posiblemente de mayor tamaño debido a una mala resuspensión después de la etapa de purificación de residuos en la ultracentrifuga.

El comportamiento temporal en el tamaño de partícula promedio es atribuido a un mecanismo efectivo de estabilización estérica por parte del poloxámero 407.

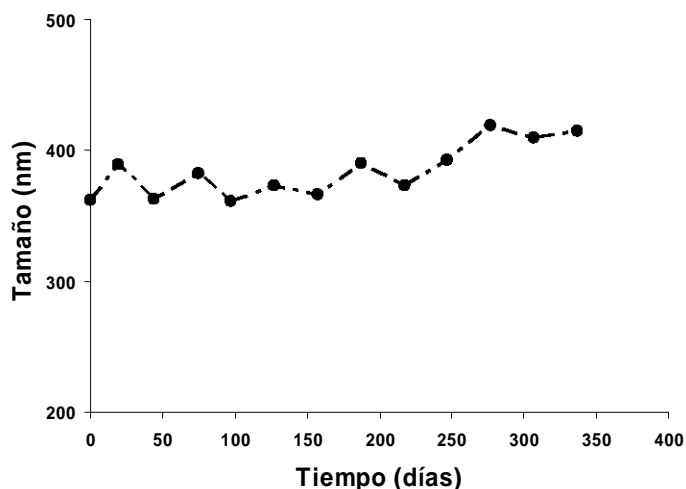


Fig. 32. Tamaño promedio de partícula de las nanoesferas lipídicas sin fármaco evaluado a través del tiempo.

7.3.2. Potencial zeta

La medida del potencial zeta muestra una aparente disminución en la estabilidad a partir de un aumento en el valor de microvolts, cabe resaltar, que un sistema es considerado estable desde que presenta valores menores a -30 mV o en su caso mayores a + 30 mV (tabla 13) [105]. En este caso, se puede observar que el potencial zeta desde su preparación no representaría a un sistema estable pues la descripción de estabilidad es de un umbral de leve dispersión (figura 33).

Tabla 13. Potencial zeta y descripción de la estabilidad [101].

Estabilidad	Potencial Z (mv)
Muy buena	-100 a -60 mv
Buena	-60 a -40 mv
Moderada	-40 a -30 mv
Umbral de leve dispersión	-30 a -15 mv
Umbral de aglomeración	-15 a -10 mv
Fuerte aglomeración y precipitación	-5 a +5 mv

Tomando en cuenta exclusivamente el valor del potencial zeta registrado (figura 33) de las muestras en evaluación de la estabilidad, no existe una relación directa e imprescindible entre el efecto producido por el estabilizante estérico y el valor del potencial zeta registrado, las moléculas de estabilizante son aniónicas y el mecanismo de estabilización no es por protección (diferencia de cargas). Por lo tanto, es por la composición matricial lipídica (ionización de grupos -OH ó de -COOH que constituyen a los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos) la presencia de una densidad de carga negativa, fenómeno electroforético, valor de potencial zeta negativo y un mecanismo de estabilización por protección indirecto. Conforme transcurre el tiempo, se da la transformación polimórfica del Compritol® ATO 888 hacia una estructura más estable y la disposición de los grupos

funcionales ionizados de los glicéridos que provocan una densidad de carga sobre la superficie de la partícula es ahora diferente, podrá ser mayor ó menor.

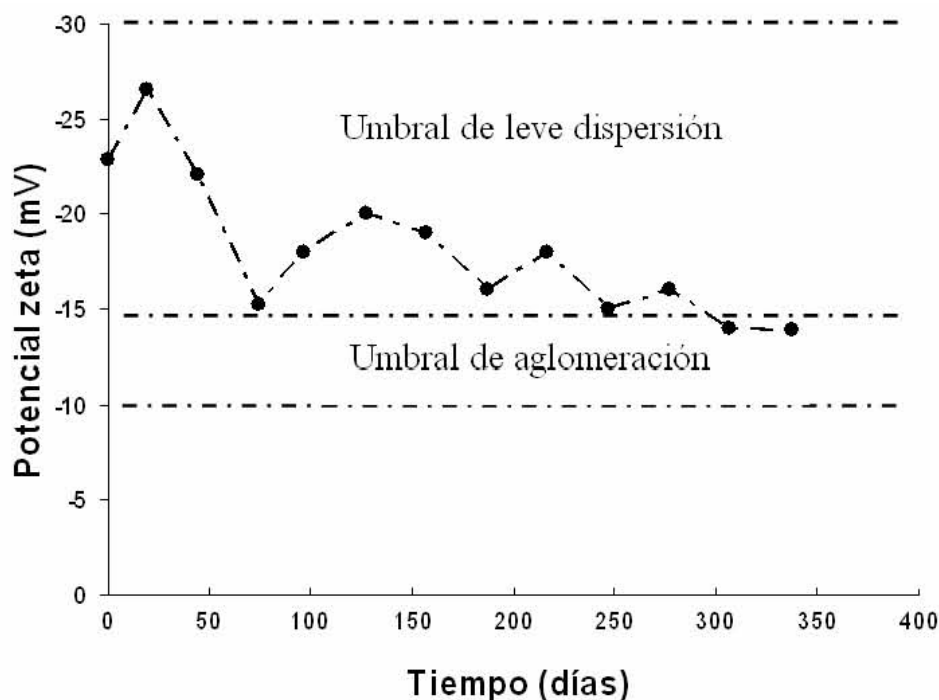


Fig. 33. Potencial zeta de las nanoesferas lipídicas sin fármaco evaluado a través del tiempo.

De acuerdo a los valores mostrados en la figura 33, parece ser que la disposición de los grupos mencionados es menor, pues ya que el potencial zeta empieza a aumentar (de -23 mV a -14 mV), esto es razonable si también se considera que durante la etapa de difusión en el proceso de manufactura las proto-nanopartículas quedan estructuradas con los grupos funcionales de sus constituyentes de una manera que favorece la interacción más estable entre la fase acuosa y la parte hidrofóbica, los grupos funcionales polares quedarán expuestos en la medida de lo posible en y hacia la superficie de la proto-nanopartícula, mientras que la parte hidrocarbonada será repelida por la fase acuosa durante la recristalización y quedará dispuesta hacia el interior de la matriz.

Aún, con la remodelación polimórfica y una aparente inestabilidad según el valor del potencial zeta registrado se puede sugerir con los datos de tpp la plausible idea de que la estabilización estérica que está presente también desde la formación de la proto-nanopartículas compense la estabilización por protección. Existe la posibilidad de que la remodelación polimórfica desadsorba una fracción del poloxámero 407, y/o que la baja temperatura de conservación empiece a provocar la solvatación de las moléculas de poloxámero 407, su desadsorción de la superficie del acarreador lipídico y una consecuente disminución en la inestabilidad del sistema. Empero, la medida de tpp parece indicar que no existe un cambio importante en el tamaño de partícula como una consecuencia de la disminución de los mecanismos de estabilización. El acarreador lipídico parece presentar una estabilidad relativa hasta aproximadamente un año, a una temperatura de 4 °C y con protección de la luz.

7.4. Incorporación del principio activo en NE. Determinación del porcentaje de carga óptima

Primeramente se planteó una evaluación cualitativa (tabla 14) en donde a partir de la observación de un sedimento en la formulación del acarreador lipídico sería un indicio de que la formulación ya no es estable (se sobrepasa la capacidad de carga de fármaco del acarreador lipídico y el mecanismo de estabilización no es únicamente sobre la superficie del acarreador, ahora habrá partículas de diverso tamaño de clonazepam dispersas en el medio que posiblemente harán que se aglomere el sistema). De esta manera, una determinación aproximada del porcentaje de carga de fármaco máximo sería la formulación próxima a la formulación inestable.

Tabla 14. Estabilidad física de dispersiones de nanoesferas lipídicas con clonazepam.

Formulación (clonazepam % p/p) ¹⁾	Agregados visibles ²⁾	Tamaño \pm D. E. (nm)
1	-	305 \pm 5
2	-	335 \pm 9
3	-	379 \pm 14
4	-	382 \pm 10
5	-	395 \pm 13
6	+++	410 \pm 12

1) El % p/p es la cantidad de fármaco en mg con respecto a 200 mg de Compritol[®] ATO 888

2) Agregados visibles, escala: nada (-), poco (+), regular (++) y mucho (+++)

La formulación de nanoesferas de Compritol[®] ATO 888 con 5 % p/p de clonazepam resultó ser la del porcentaje de carga máxima. A partir de esta aproximación de los porcentajes de carga de clonazepam tolerados por la matriz lipídica y que está en función principalmente del lípido que constituye la matriz de la nanoesfera, solubilidad en la fase orgánica y el tipo de proceso empleado para producir el acarreador, se determinó la concentración real de clonazepam en el acarreador lipídico en formulaciones de 1, 3 y 5 % p/p, además de que se evaluó la estabilidad en términos de tamaño, potencial zeta y de concentración del activo dentro del acarreador.

7.4.1. Evaluación del encapsulamiento de clonazepam y su estabilidad con el tiempo

La figura 34 muestra la variación del porcentaje de encapsulamiento real determinado según el anexo 2 con respecto al tiempo. Cabe recordar, que el porcentaje de clonazepam referido como % p/p es según la cantidad inicial de clonazepam puesta en la formulación, y es distinto al porcentaje de encapsulamiento.

Diversos autores [68, 77, 79, 80, 82] han documentado constantemente que una de las desventajas principales de los acarreadores lipídicos es su retransformación estructural en fase sólida, se plantea que en los procesos de obtención de acarreadores lipídicos de talla submicrónica el componente lipídico (que no es completamente puro, comúnmente suele ser una mezcla de diversos constituyentes grasos) cristaliza en una forma termodinámicamente no estable, por lo que será casi inevitable parar la conversión hacia la forma más estable, la mejor solución que se puede plantear para estas formulaciones es disminuir el proceso de transformación. De esta manera, durante el proceso de conservación de la formulación se trata de evitar al máximo ésta reestructuración ya sea disminuyendo la temperatura, luz ó liofilizar la muestra [80].

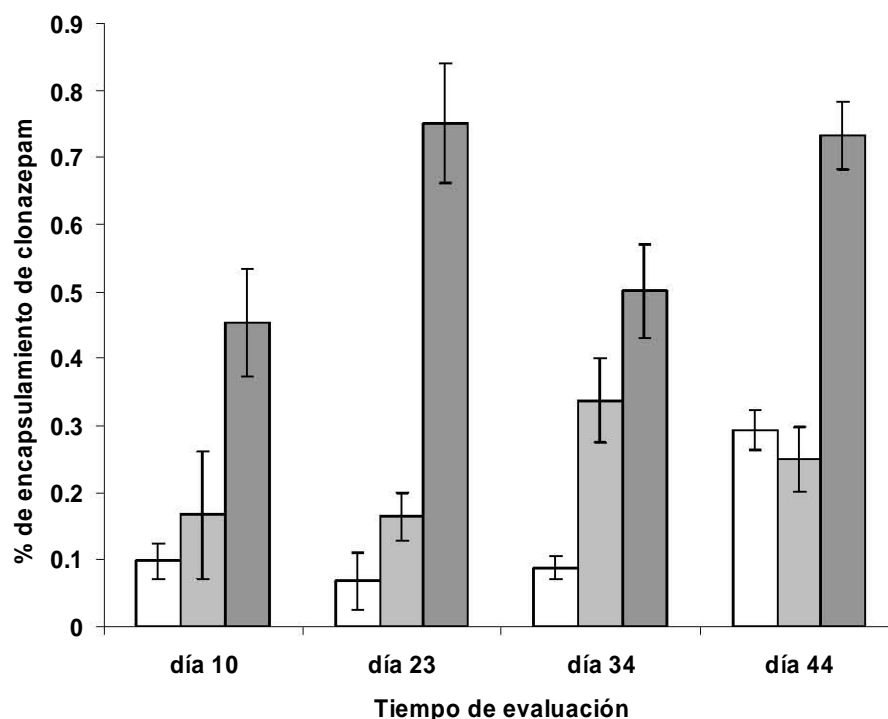


Fig. 34. Porcentaje de encapsulamiento de clonazepam y su estabilidad con el tiempo (\pm D. E.). NE + CLZ 1 % p/p (□), NE + CLZ 3 % p/p (▒), NE + CLZ 5 % p/p (■).

En la cuantificación durante los primeros días no se registró un comportamiento claro en la diferencia de porcentaje de encapsulamiento a diferentes porcentajes iniciales de clonazepam. La determinación que se realizó en los primeros días a la preparación de estas formulaciones oscila entre 5 y 10 % de encapsulamiento de clonazepam, por ejemplo, para el caso de la formulación con 5 % de clonazepam (se agregó 10 mg del fármaco) únicamente se logró retener entre 0.5 y 1 mg, la ventaja que se puede tomar de este tipo de fármacos es su alta potencia de acción terapéutica, ya que en la mayoría de las formulaciones disponibles comercialmente se le encuentra en cantidades de 0.5 a 1 mg.

El efecto del porcentaje de encapsulamiento debido al tipo de constituyente de la matriz es explicado en relación al entrecruzamiento o espacios vacíos disponibles para dar cabida al fármaco a encapsular, en este caso en particular, si en los mono, di y triglicéridos que constituyen al Compritol[®] ATO 888 son pocos, el volumen disponible para dar cabida al clonazepam es limitado, entonces el porcentaje de encapsulamiento será bajo, además de que cuando el lípido que constituye a la matriz sufra su reestructuración parte del fármaco encapsulado será expulsado.

Las evaluaciones para la determinación del porcentaje de encapsulamiento varios días después a la preparación del acarreador lipídico efectivamente muestran que hay una disminución en la cantidad del fármaco que se encuentra en el acarreador hasta los 23 días para la formulación que contiene 1 y 3 % de clonazepam, tiempo después para estas formulaciones y completamente para la de 5 % a pesar de llegar a existir diferencia significativa en el porcentaje encapsulado, no hay una tendencia contundente que demuestre la expulsión de clonazepam con el tiempo de conservación. La discrepancia de los porcentajes de encapsulamiento también podría ser atribuible a una mayor susceptibilidad de variación en la absorbancia detectada en la cuantificación debido a una baja cantidad de fármaco evaluado en las dispersiones lipídicas. Las evaluaciones se realizaron en sistemas

conservados en solución y que fueron liofilizadas dos días antes a la determinación.

En la figura 35 se muestra la eficiencia de entrapamiento (calculado según anexo 2) que es una medida de la cantidad de fármaco encapsulado según una cantidad inicial añadida en la formulación, y su variación con respecto al tiempo.

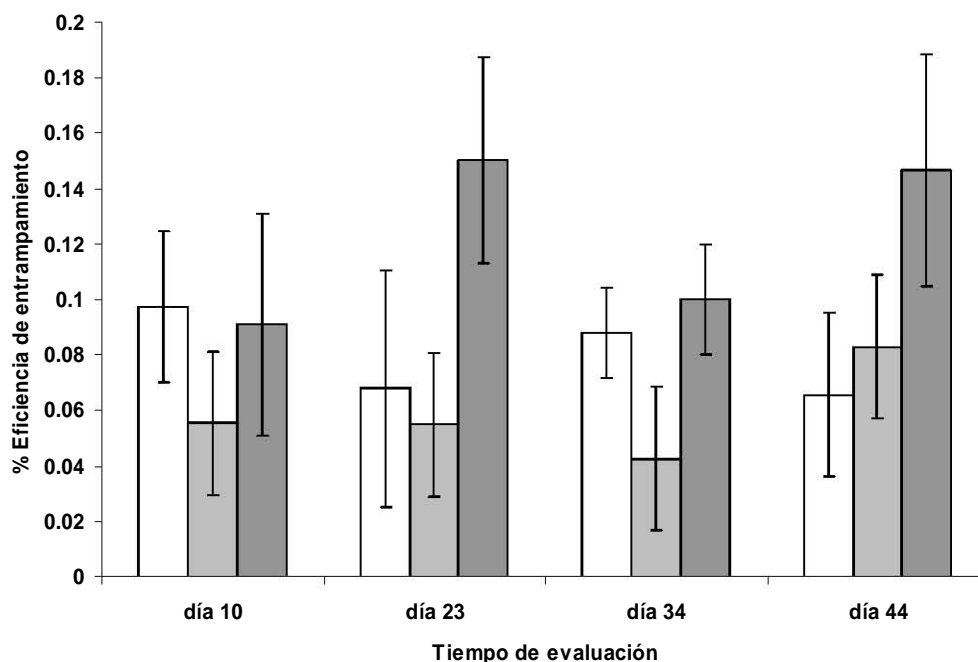


Fig. 35. Eficiencia de entrapamiento de clonazepam y su estabilidad con el tiempo (\pm D. E.). NE + CLZ 1 % p/p (□), NE + CLZ 3 % p/p (▒), NE + CLZ 5 % p/p (■).

Es de notar, que no existe tampoco una variación significativa entre las tres formulaciones, la eficiencia de entrapamiento llega a ser muy semejante y en varios casos no hay variación significativa. Ahora bien, aunque no se pueda discernir en los valores de la eficiencia de entrapamiento, hay que señalar que obviamente la formulación con 5 % p/p de clonazepam es la que contendrá mayor fármaco, por tal motivo se eligió esta formulación como la óptima para llevar a cabo las evaluaciones *in vivo*.

7.4.2. Evaluación del tamaño promedio de partícula y potencial zeta del acarreador lipídico conteniendo clonazepam a través del tiempo

Una vez que se determinó una disminución del fármaco contenido en el acarreador lipídico, resultó también importante evaluar el tamaño de partícula y potencial zeta como una medida de este posible cambio estructural, y de cómo se verá afectada la estabilidad de las dispersiones.

Con la evaluación del tamaño promedio de partícula se observa (figura 36) que no existe una variación considerable con el transcurso del tiempo, y con respecto a los diferentes porcentajes de clonazepam incorporados tampoco se observa un comportamiento claro.

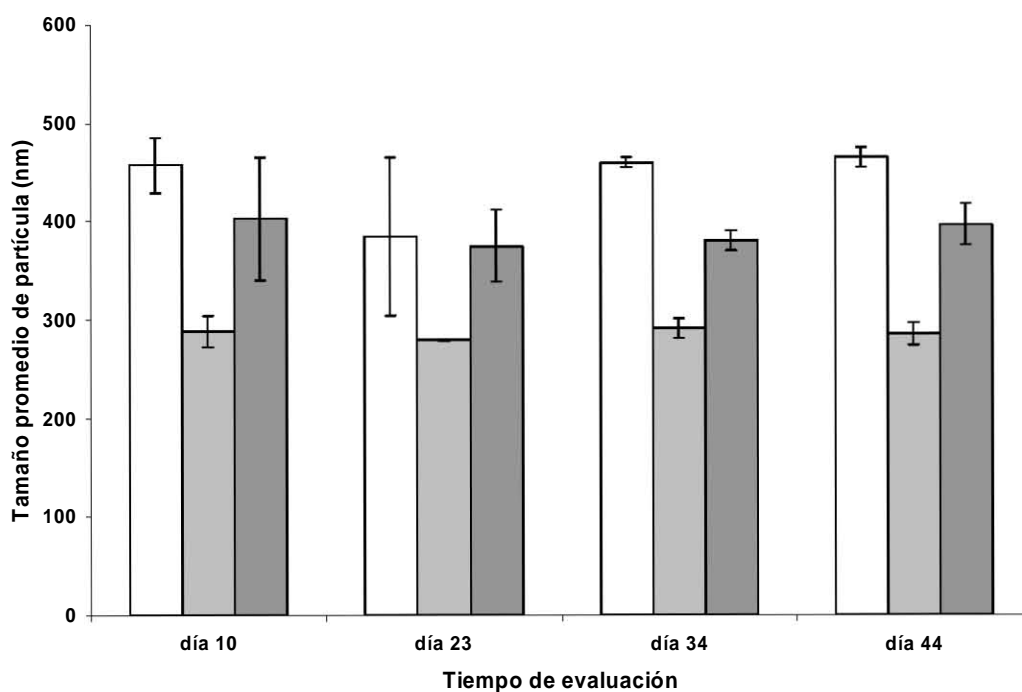


Fig. 36. Evaluación del tamaño promedio de partícula de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam a través del tiempo (\pm D. E.). NE + CLZ 1 % p/p (\square), NE + CLZ 3 % p/p (\square), NE + CLZ 5 % p/p (\square).

En un inicio se esperaba que con un aumento en el porcentaje de clonazepam incorporado se obtuvieran tamaños de partículas mayores, el fármaco entonces, forzaría a ocupar un mayor espacio en la matriz y las moléculas de glicéridos adoptarían una nueva forma final. Sin embargo, parece ser que el espacio ocupado por el fármaco no queda determinado por la presencia de éste, sino que posiblemente no existe una alta interacción entre las moléculas de glicérido y las del fármaco, ó exhiben propiedades diferentes inherentes a la molécula de cada tipo (peso molecular, coeficiente de partición, interacciones entre grupos) que provoquen una ubicación y movimiento diferente durante el proceso de difusión y por lo tanto la recristalización no incorpora proporciones completas de los constituyentes hidrofóbicos (lípidos y fármaco).

Aunque el tamaño promedio de partícula no muestre en ninguna formulación y en ningún tiempo un aumento importante que indique aglomeración de partículas, experimentalmente se observó (tabla 15) una formación de precipitado en las formulaciones.

Tabla 15. Estabilidad física de dispersiones de nanoesferas lipídicas con clonazepam a través del tiempo.

Tiempo (días)	NE+CLZ 1%	NE+CLZ 3%	NE+CLZ 5%
10	-	-	+
23	-	-	++
34	+	+	++
44	+	++	+++

Los resultados fueron determinados de forma cualitativa observando si había precipitado, la escala del precipitado observado es: nada (-), poco (+), regular (++) y mucho (+++)

Es posible que la expulsión del fármaco del acarreador lipídico sitúe partículas de clonazepam en el medio disperso y que otra parte sedimente. Las formulaciones que contienen más fármaco en el interior del acarreador lipídico lo expulsarán de

manera más rápida y en mayor cantidad. Además también el fármaco disperso en el medio puede provocar la precipitación del acarreador lipídico.

La fracción dispersa de fármaco podrá interactuar con las cadenas de polioxietileno y disminuir el efecto estabilizante del poloxámero 407. La determinación del potencial zeta muestra (figura 37) que existe una desestabilización que se atenúa con el transcurso del tiempo.

Se puede proponer que la fracción dispersa de fármaco además de interactuar con las cadenas de polioxietileno y poder formar aglomerados y sedimentar, puede existir con un aumento en la concentración de fármaco en el medio disperso una disminución en la densidad de carga de la capa de Stern, en otras palabras, cabe la posibilidad que el acarreador sea mantenido en dispersión por un mecanismo de estabilidad estérica y por protección debido a repulsión de cargas, para el último mecanismo el fármaco disminuiría la efectividad de la capa de Stern de ofrecer el mecanismo de protección por cargas

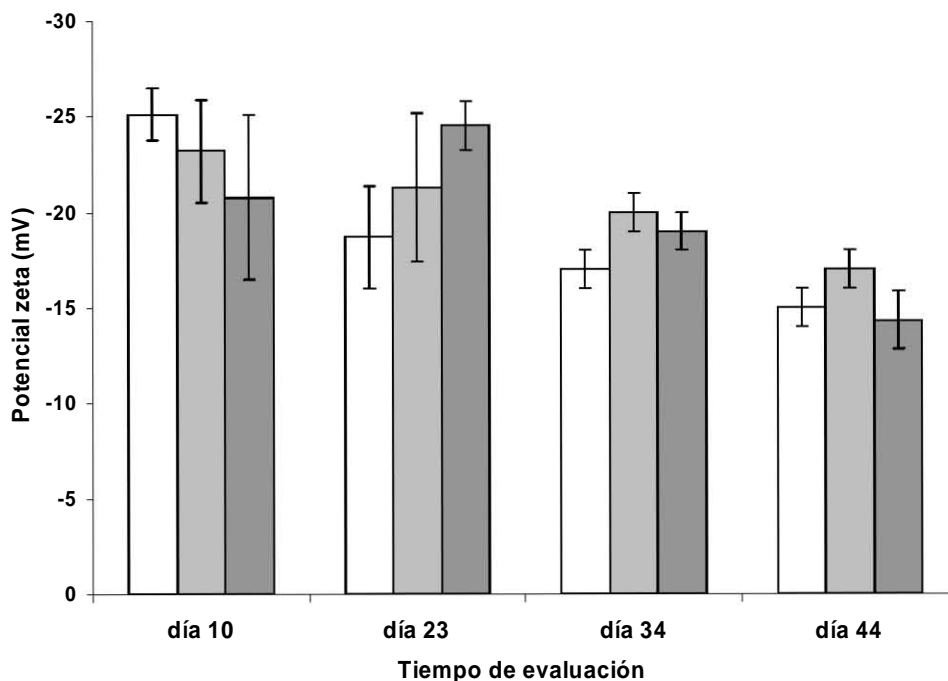


Fig. 37. Evaluación del potencial zeta de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam a través del tiempo (\pm D. E.). NE + CLZ 1 % p/p (\square), NE + CLZ 3 % p/p (\square), NE + CLZ 5 % p/p (\blacksquare).

Las muestras que habían formado precipitado y que eran agitadas resuspendían fácilmente pero al cabo de aproximadamente 2 minutos volvían a sedimentar, resultó ser un fenómeno irreversible [77,84].

7.5. Caracterización por microscopía electrónica de barrido de las nanoesferas lipídicas sin y con clonazepam

Las figuras 38-44 muestran micrografías del acarreador lipídico con 1, 3 y 5 % de clonazepam preparados por el método de emulsificación difusión. La barra principal representa una escala de 1 μm

Se puede observar que no existe una diferencia notable en el tamaño de partícula cuando se compara el diámetro de las partículas en la imagen con diferentes porcentajes de clonazepam, también se nota que no son completamente de forma esférica, algunas partículas si son esféricas y otras son amorfas, es probable que las partículas amorfas deban su forma al proceso de recristalización después de la difusión, liofilización, resuspensión ó reestructuración a su forma sólida más estable. La forma esférica es la idealizada para las partículas obtenidas por un proceso de recristalización en agitación. Es probable que cuando se crea la región de sobresaturación inmediata a la difusión, la recristalización primero en forma de proto-nanopartículas se de a altas velocidades de agitación y en un choque constante con moléculas de la fase acuosa con estabilizante, lo que origina que las proto-nanopartículas (de carácter hidrofóbico) adquieran la forma geométrica termodinámica más estable (de menor energía), una esfera.

Si bien, también se pueden observar partículas de tamaño próximo a 1000 nm pero son escasas, parece ser que el rango de tamaño de partículas de manera predominante es menor a 500 nm.

Las figuras 45 y 46 representan micrografías de polvo de clonazepam puro, la forma lisa no definida es atribuida a la hidratación de los cristales, y se observa

también que éstos no tienen una forma definida (amorfos) y son de tamaño variable (aproximadamente 0.5 – 8 μm).

Las figuras 47 y 48 muestran micrografías del acarreador lipídico sin clonazepam incorporado, resulta ser que tienen una forma igual y tamaño ligeramente menor a las partículas del acarreador con clonazepam.

Hasta éste momento, con los resultados presentados en el reporte de esta investigación se ha hecho la suposición de que la cantidad cuantificada de clonazepam en preparaciones del acarreador lipídico con este fármaco es debida exclusivamente a la que se encuentra en el interior o superficie (de cualquier manera ligado) al acarreador lipídico, sin embargo, cabe también el hecho de que el clonazepam no sea incorporado en el acarreador lipídico y durante el proceso de emulsificación – difusión se formen nanocristales de clonazepam, y estos sean también estabilizados por el poloxámero 407 y pasen por desapercibidos como partículas del acarreador. A partir de esta hipótesis, se elaboraron lotes con únicamente la cantidad de clonazepam igual a la incorporada que como cuando se elaboraba el acarreador lipídico con el clonazepam y se realizó el proceso completo de purificación y liofilización. Las figuras 49-53 muestran micrografías de partículas con un tamaño promedio de 500 nm, es decir, muy semejante al que presenta el acarreador lipídico y que podría confirmar la hipótesis planteada, más adelante, con los análisis derivados de las pruebas de calorimetría diferencial de barrido se demuestra que existe clonazepam incorporado en el acarreador lipídico.

En la obtención de los nanocristales de clonazepam fue difícil separar las partículas durante la etapa de centrifugación, la mayor parte fue eliminada junto con los residuos de estabilizante. Así que se presupone y se demuestra con la poca (prácticamente escasa y casi imposible de capturar) presencia de nanocristales, que la cantidad de clonazepam cuantificado en dispersiones del acarreador lipídico conteniendo al fármaco sea en mayor parte debido al fármaco incorporado en el interior del acarreador (o adsorbido).

Micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido de nanoesferas lipídicas con clonazepam al 1, 3 y 5 % p/p.

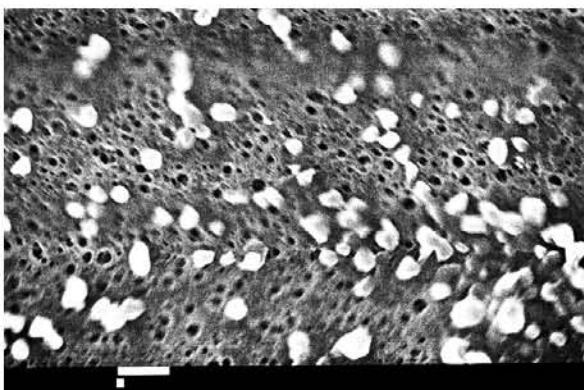


Fig. 38. NE+CLZ 1 % (10, 000x).

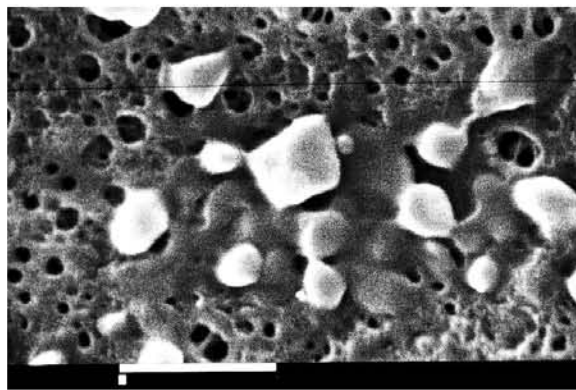


Fig. 39. NE+CLZ 1% (30, 000x).

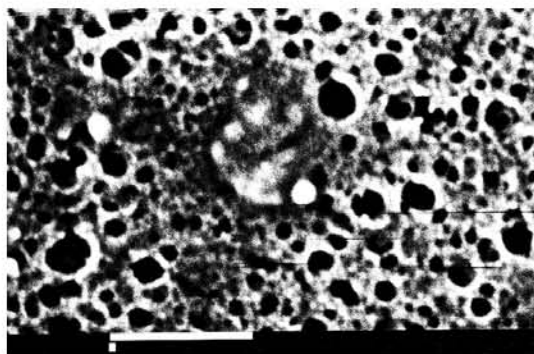


Fig. 40. NE+CLZ 3% (20, 000x).

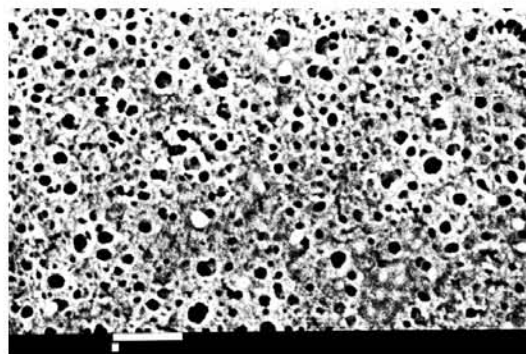


Fig. 41. NE+CLZ 3% (15, 000x).

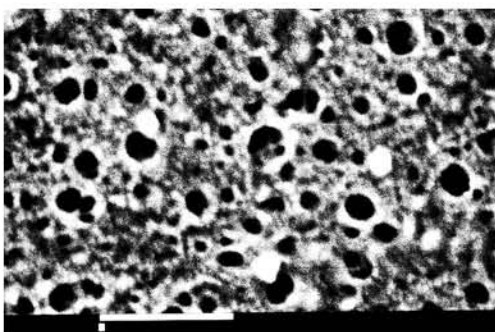


Fig. 42. NE+CLZ 3% (30, 000x).

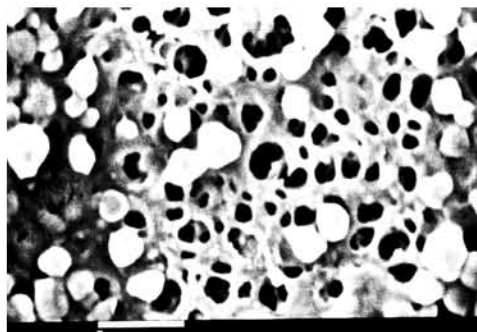


Fig. 43. NE+CLZ 5% (30, 000x).

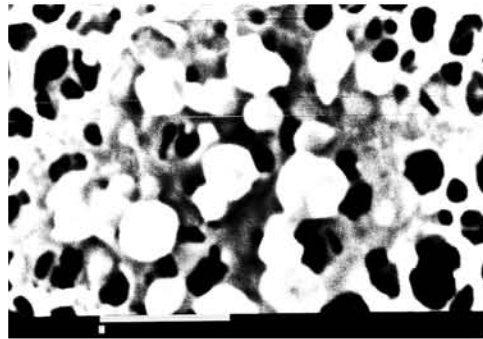


Fig. 44. NE+CLZ 5% (30, 000x).

Micrografías del fármaco puro y de nanoesferas blanco.

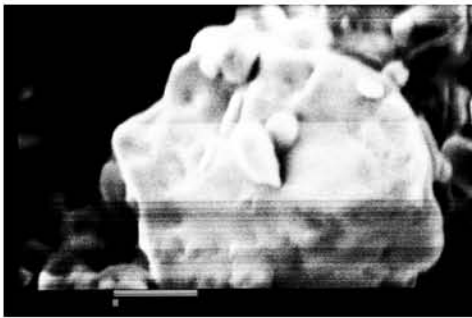


Fig. 45. Clonazepam puro (30, 000x).

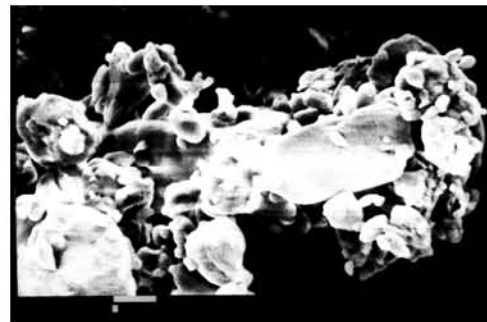


Fig. 46. Clonazepam puro (10, 000x).

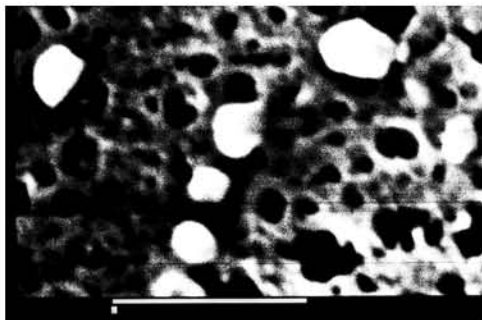


Fig. 47. NE blanco (30, 000x).

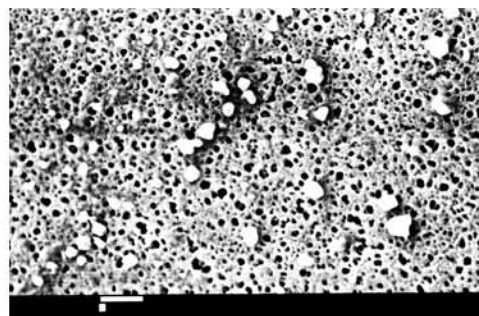


Fig. 48. NE blanco (10, 000x).

Micrografías que muestran nanodispersiones del fármaco obtenidas por el método de emulsificación – difusión.

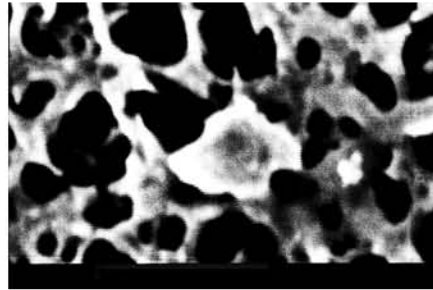


Fig. 49. CLZ 1% disperso (45, 000x).

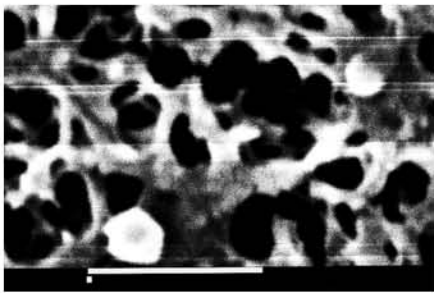


Fig. 50. CLZ 3% disperso (45, 000x).

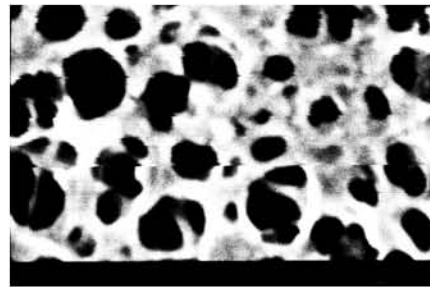


Fig. 51. CLZ 3% disperso (45, 000x).



Fig. 52. CLZ 5% disperso (45, 000x).



Fig. 53. CLZ 5% disperso (45, 000x).

7.6. Caracterización por calorimetría diferencial de barrido del acarreador lipídico sin y con clonazepam

En la figura 54 se muestra el termograma del Compritol[®] ATO 888 con un pico de fusión a una temperatura aproximada a la reportada en la literatura (69 – 74 °C), después no se observa un cambio en el flujo de calor que indique la descomposición del material ni tampoco pérdida de agua. El punto de fusión que presenta el poloxámero también corresponde al reportado en la literatura (53 – 57 °C).

El termograma del acarreador lipídico muestra los picos característicos de los ingredientes que lo constituyen, al observar que no hay un desplazamiento en los picos de fusión se puede aseverar que no existe interacción química entre el Compritol[®] ATO 888 y el poloxámero 407, cada uno mantiene su constitución original (el poloxámero únicamente se encuentra adsorbido sobre la superficie de la matriz lipídica).

En la figura 55 se observa el termograma del clonazepam cuyo pico de fusión también corresponde al reportado en la literatura (237 – 240 °C) e inmediatamente después se empieza a observar un pico de eliminación de calor que indica la descomposición del fármaco.

En la comparación del comportamiento térmico del acarreador lipídico con el clonazepam incorporado cabía la posibilidad de encontrar al fármaco en una interacción física o química. Para comparar la interacción física se preparó una mezcla de poloxámero 407, Compritol[®] ATO 888 y clonazepam al 5% p/p, en la figura 55 se pueden observar los picos de fusión característicos de cada ingrediente.

El termograma del acarreador lipídico conteniendo al clonazepam no muestra el pico de fusión del fármaco a 1% de clonazepam, ni tampoco a 3 y 5 % como se

muestra en la figura 56. El hecho de no observar el pico de fusión del clonazepam es muy probable que se deba a que se encuentra disperso molecularmente tal que ya no se observe la fusión de los cristales de fármaco (las moléculas ya están dispersas y no necesitan energía para separarlas de un cristal).

En la figura 57 se muestra el termograma comparativo del punto de fusión del Compritol[®] ATO 888 formando al acarreador sin clonazepam y otro termograma cuando tiene incorporado al clonazepam, se observa una desviación en el punto de fusión que aunque es mínima (2 °C) podría indicar una interacción química entre el Compritol[®] ATO 888 y el clonazepam provocando un desplazamiento en el punto de fusión (ahora en las redes del lipídio sólido se encuentran incrustadas moléculas del fármaco, el calor necesario para fundir este cristal mezclado será menor debido a que las moléculas de fármaco provocan una disminución en las fuerzas de enlace promedio)

En la figura 58 se observa el termograma comparativo del punto de fusión del clonazepam, en la mezcla física e incorporado en el acarreador lipídico, ambos sistemas muestran el pico de fusión característico del clonazepam. En este rango de temperatura las nanoesferas con fármaco tienen un comportamiento similar a las nanoesferas blanco.

De esta manera, se asevera con alta probabilidad de que el clonazepam se encuentra disperso molecularmente en la matriz lipídica del acarreador.

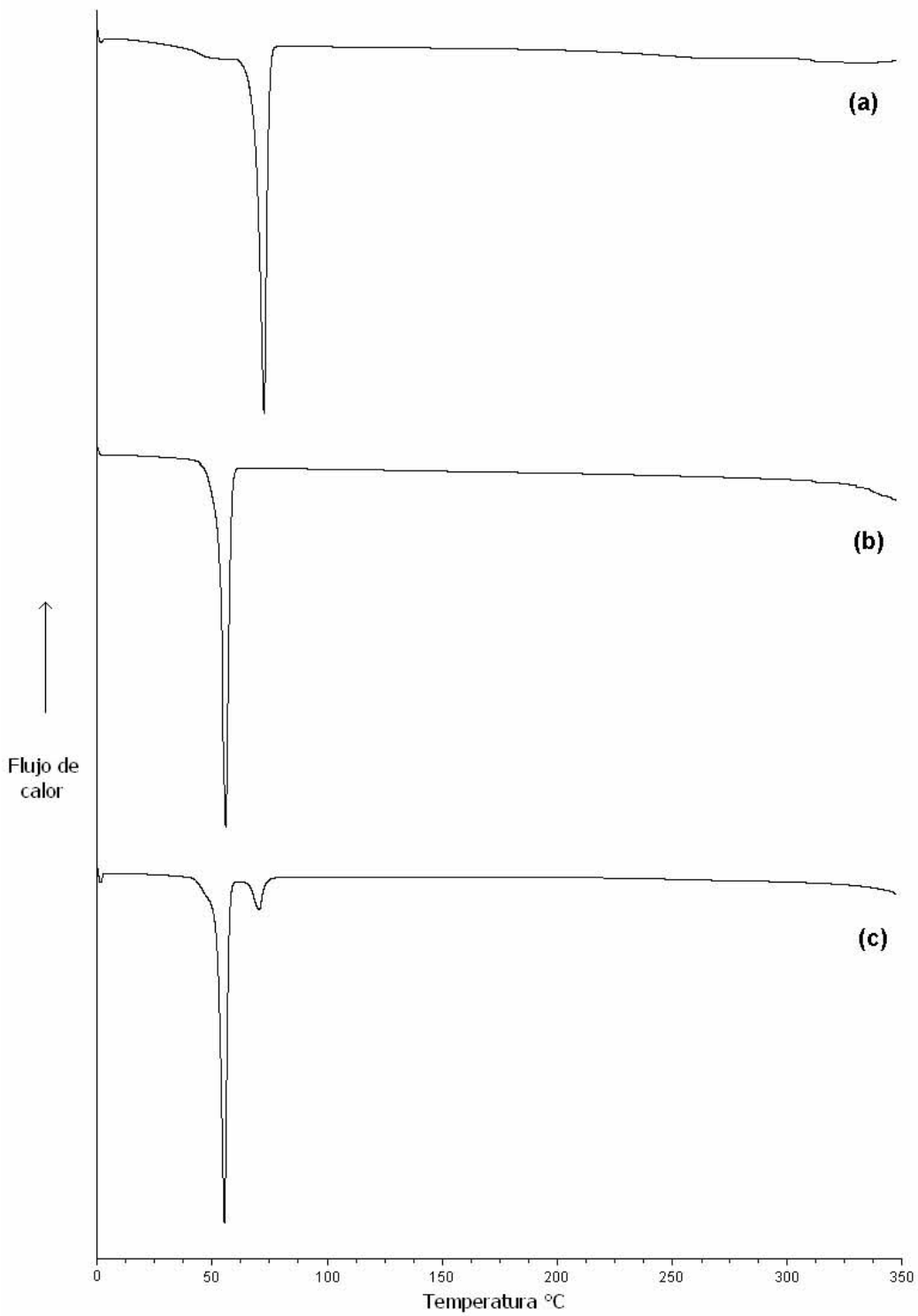


Fig. 54. Termogramas (DSC) de ingredientes y acarreador lipídico; Compritol® ATO 888 (a), poloxámero 407 (b) y acarreador lipídico sin fármaco (c).

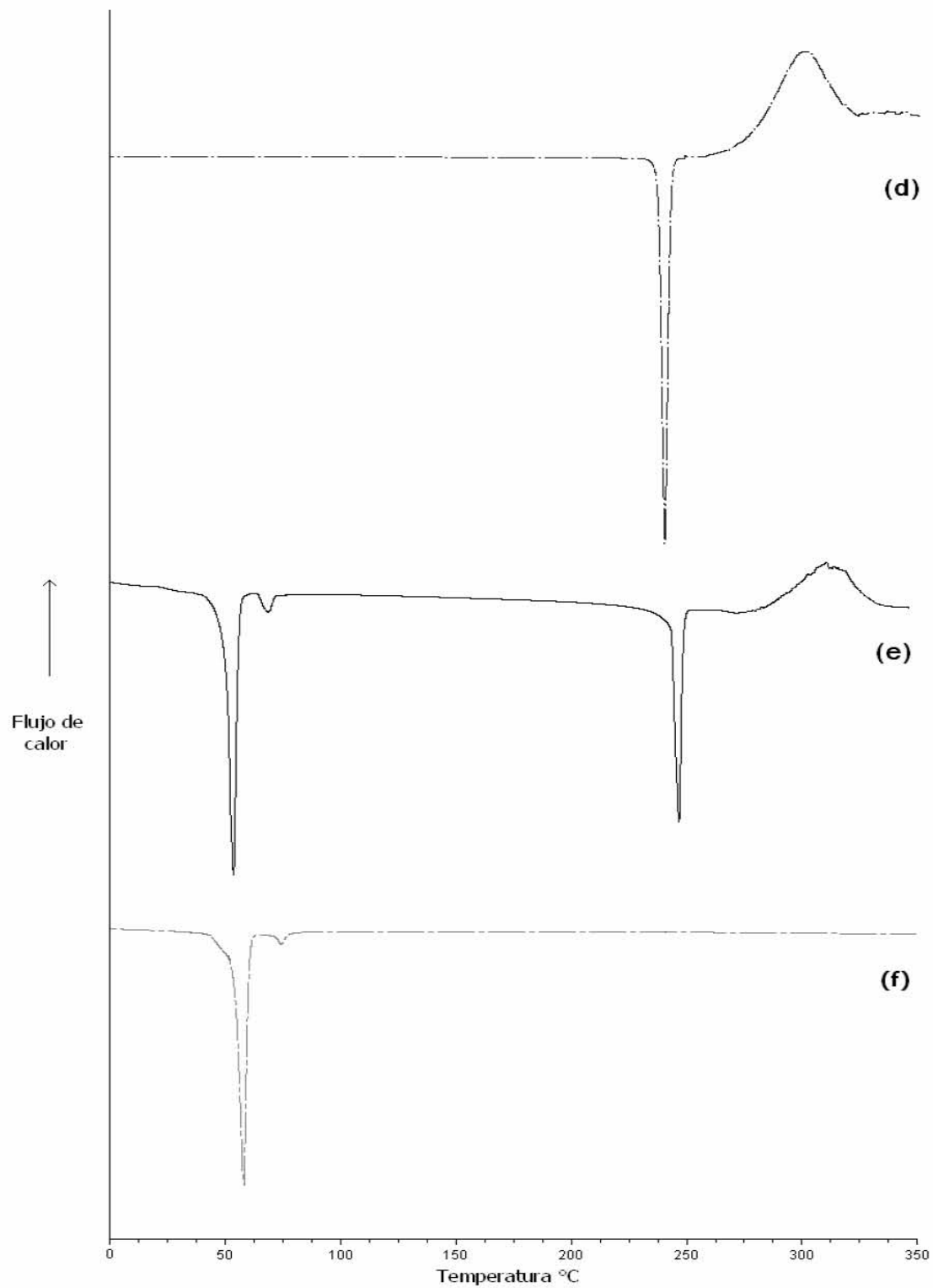


Fig. 55. Termogramas (DSC) del fármaco y en combinación con el acarreador lipídico; clonazepam puro (d), mezcla física de clonazepam con Compritol® ATO 888 y poloxámero 407 (e) y acarreador lipídico con clonazepam (f).

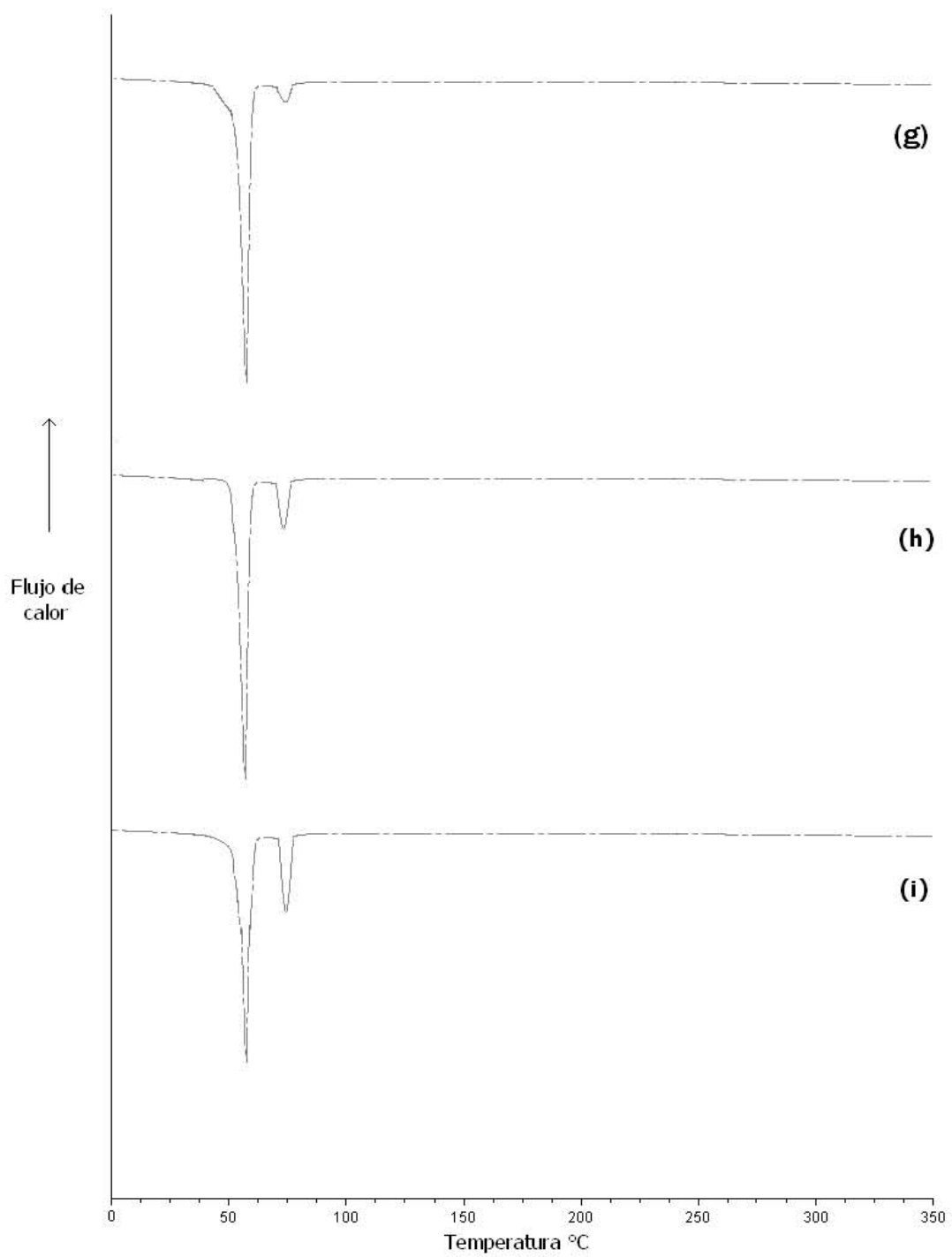


Fig. 56. Termogramas (DSC) del acarreador lipídico con fármaco incorporado en diferentes porcentajes; 1 % p/p (g), 3 % p/p (h) y 5 % p/p (i).

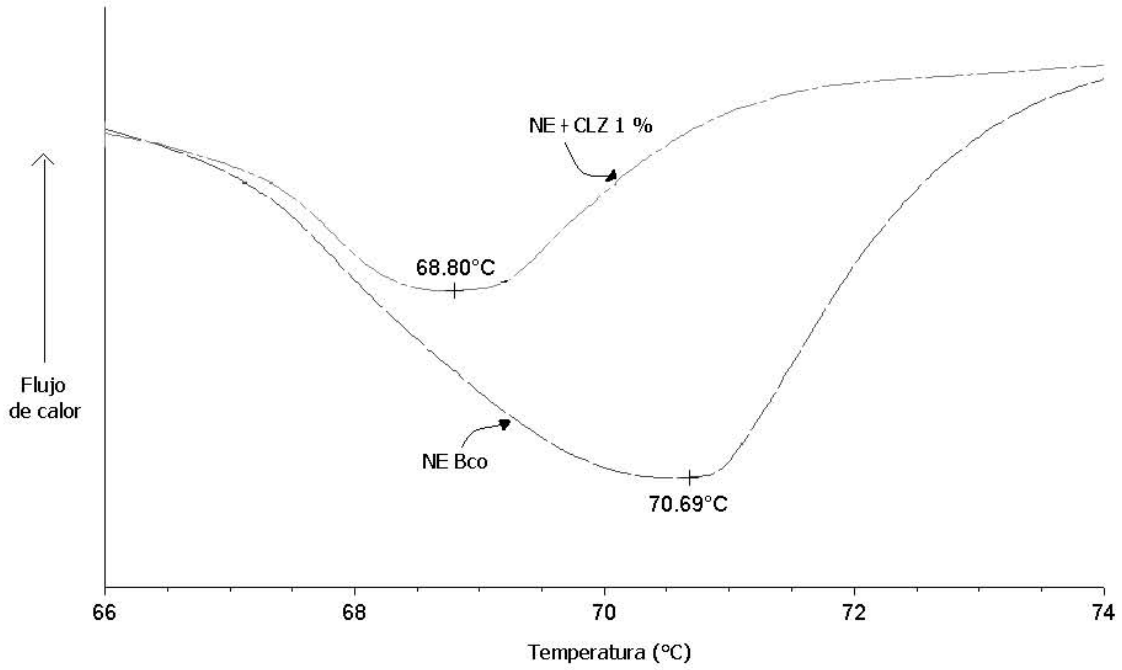


Fig. 57. Termogramas (DSC) comparativos para el desplazamiento del punto de fusión del Compritol® ATO 888.

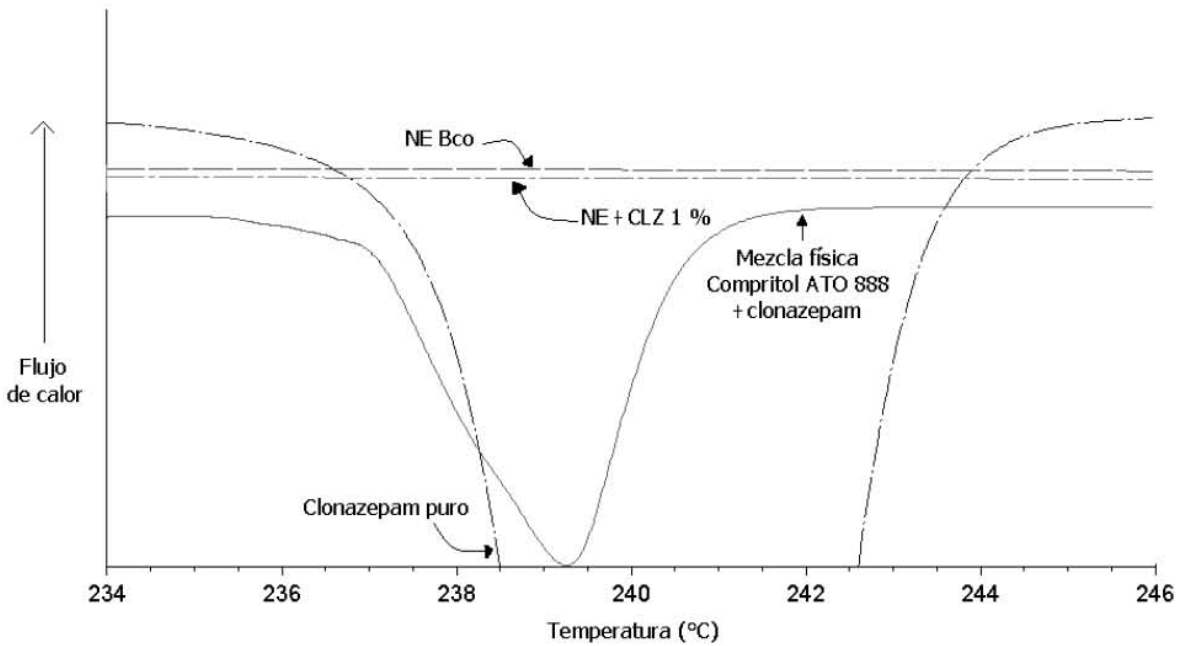


Fig. 58. Termogramas (DSC) comparativos del punto de fusión del clonazepam, las formulaciones del acarreador propuesto y su mezcla física.

7.8. Evaluación *in vivo*

La evaluación del efecto ansiolítico de las nanoesferas lipídicas conteniendo al clonazepam se realizó con el modelo de *Plus Maze* elevado a los 15 minutos después de haber administrado cada sistema. El principal indicativo de un efecto ansiolítico en este modelo es el registró de un incremento en el número de entradas en los brazos abiertos y de su permanencia en estos. La evaluación del acarreador lipídico conteniendo al clonazepam a dosis terapéutica y a la mitad de la dosis terapéutica se realizó suponiendo que el acarreador mejoraría el paso del clonazepam a través de la barrera hematoencefálica y por tanto se observaría un efecto semejante al terapéutico a una dosis menor.

Los 7 conjuntos de datos (correspondiente a cada sistema evaluado) forman muestras aleatorias e independientes. Se supone que las 7 poblaciones de medición siguen una distribución normal con variancias iguales, por lo que se realizaron pruebas de contraste de hipótesis, suponiendo como hipótesis nula que los 7 sistemas producen la misma respuesta y como hipótesis alterna que los 7 sistemas no producen la misma respuesta. El ANADEVVA muestra que en todos los casos (de entradas y tiempos de permanencia en cada región de análisis del modelo) se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna. Una vez realizado el análisis estadístico de las medias de los datos de cada sistema por regiones del modelo en base a número de entradas y tiempo de permanencia, se expresan en las figuras 59 y 60 como porcentajes en referencia a un total de cada sistema considerado como la suma de entradas o tiempo de permanencia en los brazos cerrados y en los brazos abiertos del modelo de *Plus Maze* elevado.

Como se puede observar en la figura 59, la preparación con mayor porcentaje de entradas en brazos abiertos es la que corresponde al lote de nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam administradas en la cantidad especificada para producir un efecto terapéutico, y la preparación del acarreador lipídico a la mitad de la dosis

terapéutica presenta un número de entradas similar que cuando se administra en dosis terapéutica.

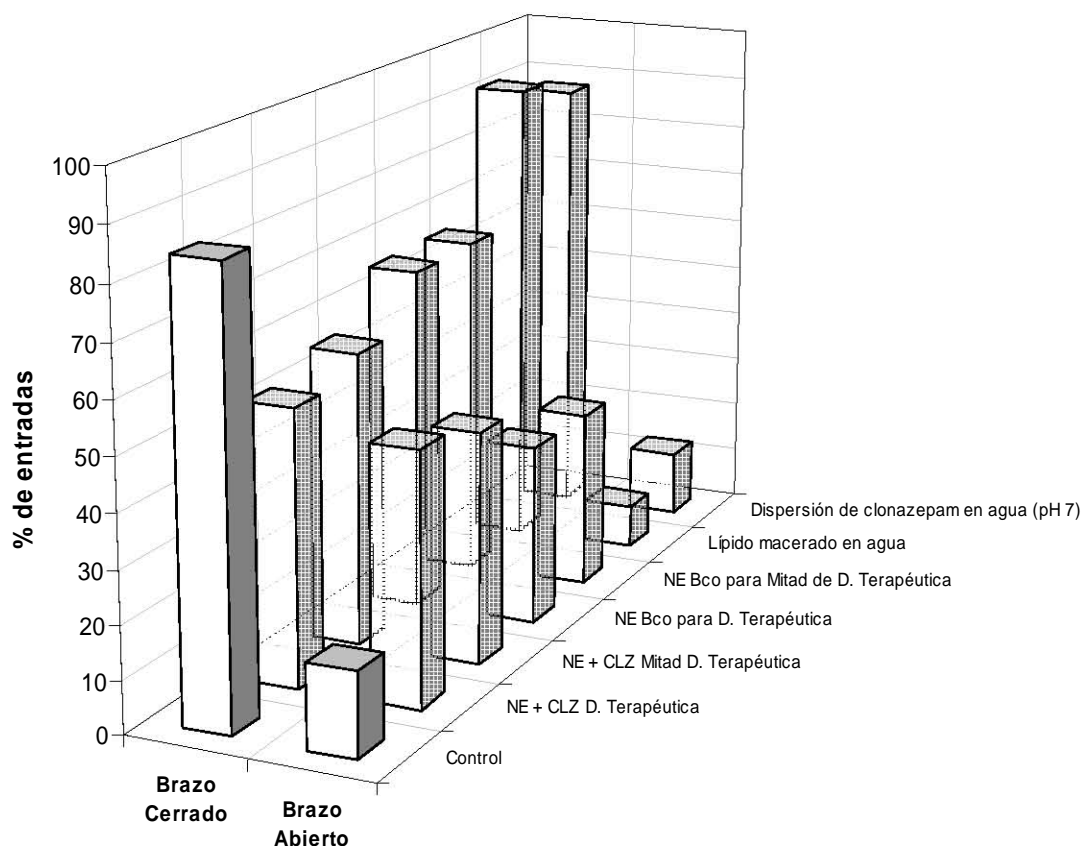


Fig. 59. Evaluación *in vivo* de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam. Porcentaje de entradas en brazos cerrados y abiertos en el modelo de *Plus Maze* elevado como medida del efecto ansiolítico (n = 12).

En la figura 60 se puede observar como también las nanoesferas lipídicas con clonazepam a una dosis terapéutica son las que producen el mayor porcentaje de permanencia en los brazos abiertos, es decir, producen un mayor efecto ansiolítico. Cuando se administró a la mitad de la dosis terapéutica el efecto ansiolítico producido según el porcentaje de permanencia en los brazos abiertos es aproximadamente la mitad de cuando se administran nanoesferas lipídicas a

una dosis terapéutica. Se puede decir que cuando se administró nanoesferas lipídicas con clonazepam a la mitad de la dosis terapéutica se logró un efecto ansiolítico pero no fue sostenido, por la poca permanencia observada en los brazos abiertos.

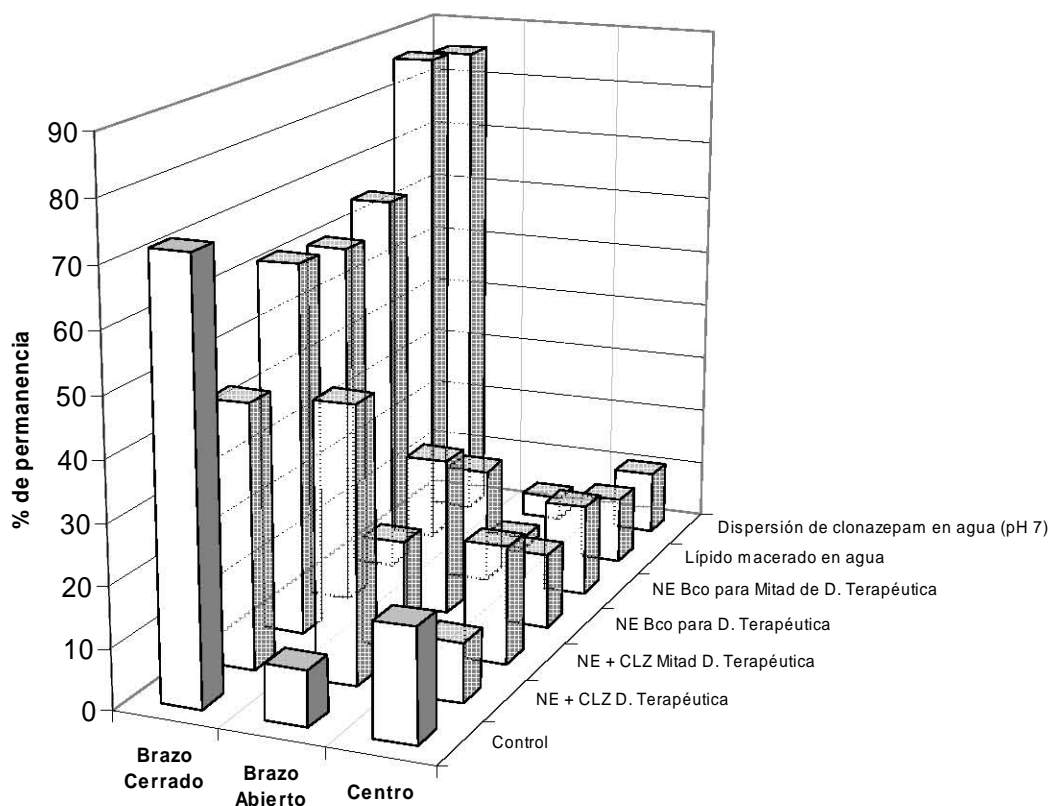


Fig. 60. Evaluación *in vivo* de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam. Porcentaje de permanencia en brazos cerrados y abiertos en el modelo de *Plus Maze* elevado como medida del efecto ansiolítico (n = 12).

El acarreador lipídico que contiene al clonazepam administrado para producir un efecto terapéutico es el que presenta mayor entradas a los brazos abiertos, y además mayor permanencia en estos brazos, lo que puede sugerir un efecto atenuado.

Las preparaciones del lote control, nanopartículas sin principio activo para la mitad de la dosis terapéutica, dosis terapéutica y lípido disperso en agua sirvieron como lotes de referencia que no deberían de presentar entradas en brazos abiertos (no inducen efecto ansiolítico), la dispersión de clonazepam a pH = 7 es un sistema simple con potencial efecto terapéutico. Tomando como referencia el número de entradas del lote control, se observa que aún este lote presenta un porcentaje de entradas a los brazos abiertos (9.24 %), es decir, que dentro del comportamiento innato de los ratones cabe la exploración en espacios de peligro y no su limitación completa al refugio (en este caso en los brazos cerrados). La dispersión de clonazepam presenta un porcentaje de entradas similar al lote control (12.5% y 15.96% respectivamente) a partir de lo cual se puede decir que no existe un efecto ansiolítico cuando el fármaco es administrado de esta manera, aún, si el efecto registrado correspondiera a un efecto efectivamente ansiolítico significaría que el clonazepam es absorbido por su forma no ionizada. Tomando en cuenta el porcentaje de permanencia (figura 60) se observa que el efecto ansiolítico producido por este sistema es incluso menor que el lote control, en otras palabras, demuestra no tener un efecto ansiolítico.

Para los lotes de lípido macerado en agua, y dispersiones de nanopartículas blanco, el % de entradas en los brazos abiertos como un posible efecto ansiolítico quedaría descartado si se debe a un efecto de digestión de grasas (el Compritol[®] ATO 888 que constituye la matriz lipídica es una grasa, ester de ácido graso con glicerol), figura 61. En el páncreas la presencia del quimo ácido (contenido del estomago que pasa intermitentemente durante la digestión hacia el duodeno a través del píloro. Los conductos pancreático y colédoco se abren en el duodeno en un punto cercano al píloro. El contenido muy alcalino de las secreciones pancreática y biliar neutraliza el ácido del quimo y hace virar el pH de este material hacia la alcalinidad. Este cambio en el pH es necesario para la acción de las enzimas contenidas en los jugos pancreático e intestinal) activa al duodeno para producir (1) secretina que estimula hormonalmente al flujo del jugo pancreático; (2) pancreozimina, que estimula la producción de la enzima lipasa (esteapsina) cuyo

substrato son las uniones éster primarias de las grasas (presente en los mono, di y triglicéridos que constituyen al Compritol[®] ATO 888), los productos finales son ácidos grasos, monoglicéridos y glicerol, para ser absorbidos hacia el torrente sanguíneo. En hígado y vesícula biliar las enzimas sales biliares y álcalis son producidas después de que las hormonas del intestino colecistocinina y hepatocinina estimulan la vesícula biliar y al hígado, su substrato es la grasa (que puede ser el Compritol[®] ATO 888) y también neutraliza el quimo ácido, el producto final es un conjugado de ácidos grasos con sales biliares, emulsiona finalmente a grasa neutra.

La hidrólisis completa de las grasas (triglicéridos) produce glicerol y ácidos grasos. Sin embargo, la hidrólisis del primero, del segundo y del tercer ácido graso de los triglicéridos se realiza con creciente dificultad, necesitándose condiciones especiales para la remoción del último ácido graso (la mayor parte de los constituyentes del Compritol[®] ATO 888 son diglicéridos, este paso sería el principal para convertirlo hasta ácidos grasos y glicerol, su digestión sería entonces lenta). La lipasa pancreática es específica para la hidrólisis de las uniones éster primarias; por esta razón, en la digestión de un triglicérido por la lipasa ocurriría primero la separación de un ácido graso terminal para producir un 1, 2-diglicerido y después se separaría el otro ácido graso terminal para producir un 2-monoglicérido. Puesto que este último ácido graso está unido por un grupo éster secundario, su remoción requiere la isomerización a una unión éster primaria. Esto constituye una reacción relativamente lenta (aproximadamente 50% de la digestión del Compritol[®] ATO 888 generaría una isomerización de 2-monoglicerido a 1-monoglicerido para completar la digestión), por lo cual resulta, que los monoglicéridos constituyen los principales productos finales de la digestión de las grasas, ya que menos de la tercera parte de la grasa ingerida es completamente demolida hasta glicerol y ácidos grasos. Este motivo explica porque se observa un aparente efecto atenuado ansiolítico en los ratones, mientras que en realidad es muy probable al mecanismo de digestión [4].

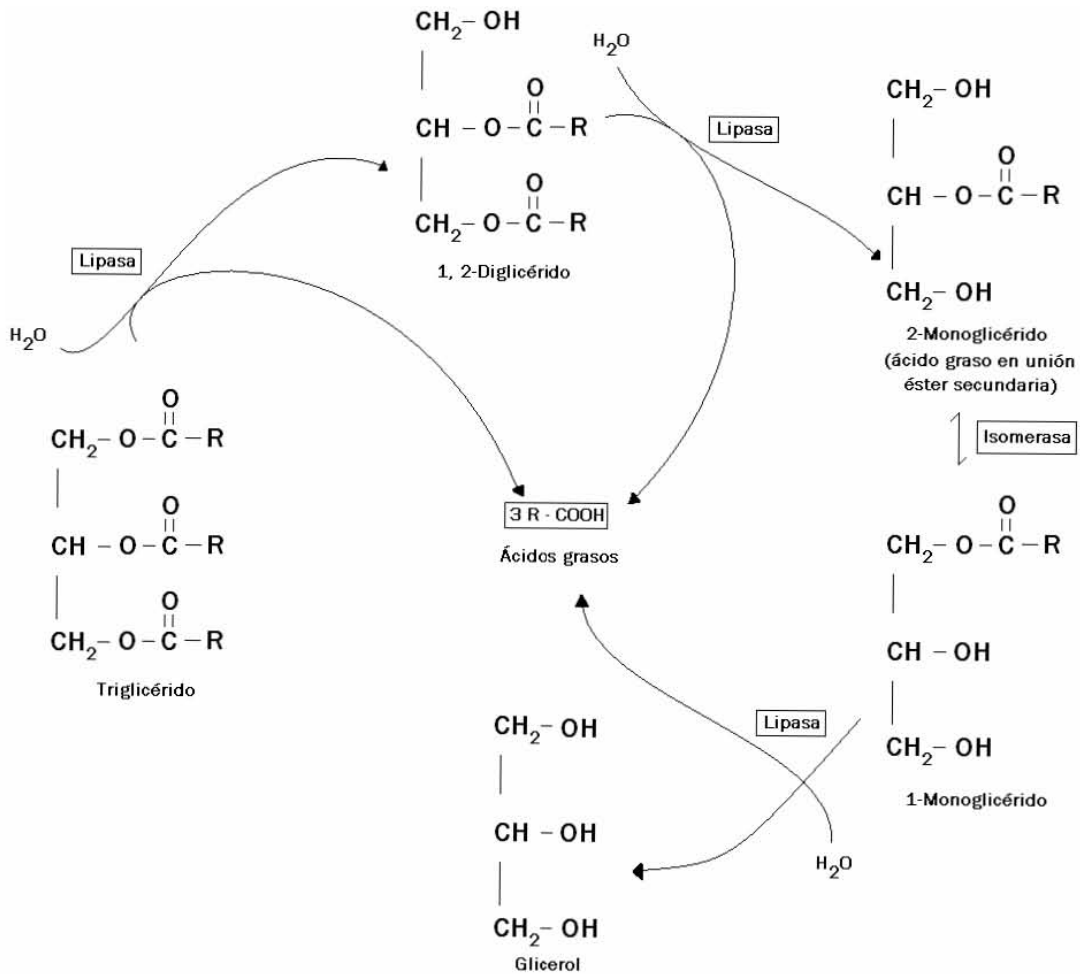


Fig. 61. Mecanismo de digestión de mono, di y triglicéridos [4].

Ahora bien, este mismo mecanismo es tomado para explicar la digestión de las nanoesferas lipídicas, además de tomar en cuenta las propiedades adhesivas de los lípidos a las paredes intestinales, en esta región pueden estar ocurriendo principalmente dos mecanismos simultáneos de interacción con las NP's (figura 62), considerando que la composición del Compritol® ATO 888 es de 12-18 % de monoglicéridos, 52-54 % de diglicéridos y un 28-32 % de triglicéridos:

Una fracción de nanoesferas puede adherirse a la pared intestinal y sufrir una ligera acción por parte de la lipasa, alguna fracción de diglicéridos y triglicéridos es

degradada hasta monoglicéridos mientras que se da una liberación de fármaco entrampado en esta región de la NP degradada, finalmente es absorbida y pasa casi sin una modificación estructural importante al torrente sanguíneo.

Mientras que una fracción de nanoesferas logra adherirse a la pared intestinal otra fracción de NP's es degradada casi completamente por la lipasa, el metabolismo de triglicéridos y diglicéridos hasta monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol es completado. Después, otra fracción de NP's ó residuo de NP's puede ser emulsificado por las sales biliares y álcalis y también ser absorbido.

La absorción de nanoesferas lipídicas en la pared intestinal puede verse como un mecanismo saturable, la primera fracción logra la adhesión sin degradación considerable y la última fracción que satura el mecanismo de absorción sufre una degradación considerable.

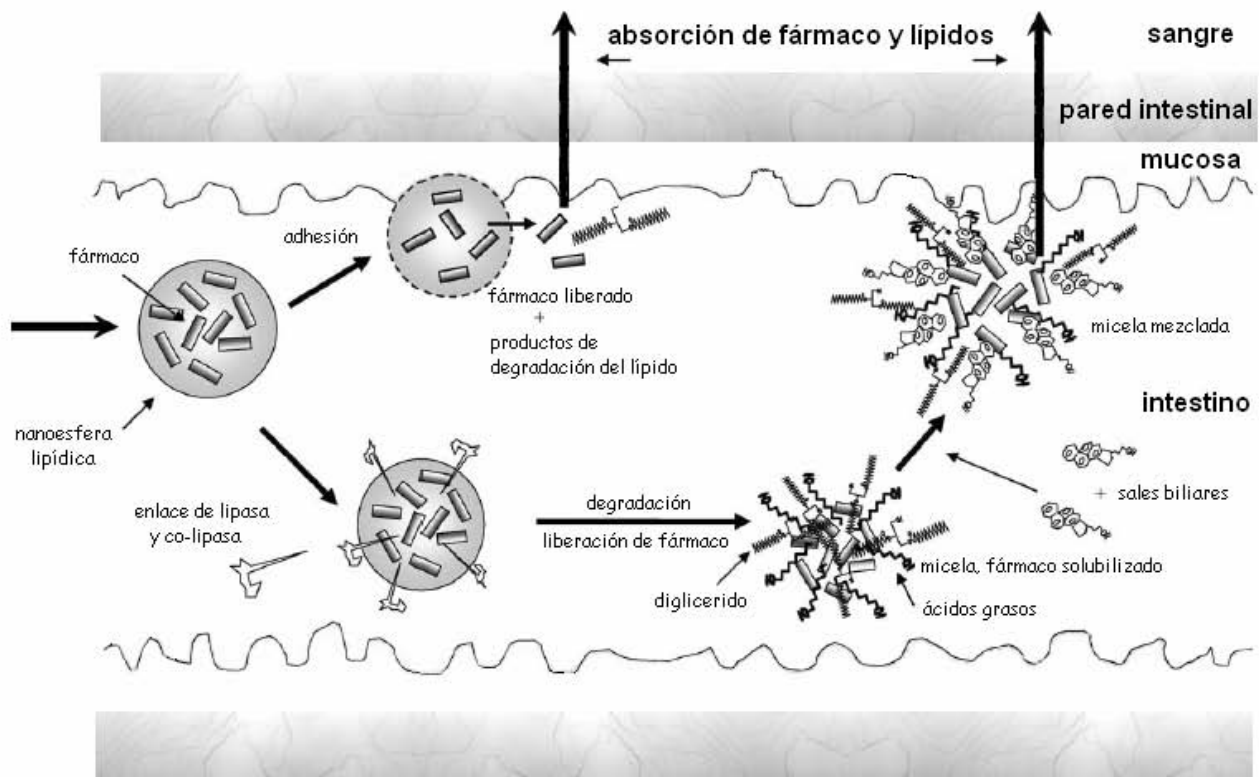


Fig. 62. Mecanismo del efecto de promoción de absorción de lípidos [67].

Estos dos mecanismos que podrían estar ocurriendo de manera simultánea explican el incremento en la absorción del fármaco debido a la composición matricial de las nanoesferas utilizadas en esta investigación [67].

Debido a que el glicerol es hidrosoluble, es fácilmente absorbido por el intestino, pero los ácidos grasos y los monoglicéridos, poco solubles en un medio acuoso requieren de un mecanismo auxiliar para su absorción. La combinación de las sales biliares con los ácidos grasos produce un producto soluble (los complejos hidrotrópicos), que pueden ser absorbidos en la luz del intestino por las células de la mucosa que reviste su pared. Después de que los complejos de ácidos grasos con sales biliares y el glicerol han pasado las células de la mucosa intestinal, el ácido graso es liberado de la sal biliar y se recombina con el glicerol para resintetizar una grasa neutra (se resintetizan los triglicéridos).

Ante los dos mecanismos explicados anteriormente de posible absorción de nanoesferas lipídicas, cabe otra posibilidad. La grasa no hidrolizada puede ser absorbida si se encuentra dispersa como partículas muy finas (menores de 500 nm) [4], y las NP's propuestas son menores a este tamaño, por lo tanto, una fracción puede atravesar sin modificación alguna exclusivamente por su tamaño.

Finalmente las nanoesferas que pasaron casi intactas por la pared intestinal (efecto de caballo Troyano) hacia el torrente sanguíneo son distribuidas por todo el organismo y llegan a estar en contacto con la BHE. La parte que paso como emulsificada es resintetizada a triglicéridos, es una reacción enzimática específica, por lo que el fármaco atrapado en las micelas o complejos hidrotrópicos es muy probable que sea liberado al torrente sanguíneo y viaje como fracción libre y unido a proteínas, los triglicéridos resintetizados también se unen a proteínas formando los quilomicrones, son partículas lipoproteicas con tamaño cercano a 1 μm de diámetro. De esta manera, una aportación al efecto terapéutico final observado en el ratón es por el fármaco libre (unido a proteínas y completamente libre) en el torrente sanguíneo que es como queda dispuesto después de la administración en

una forma farmacéutica convencional (tableta), y la segunda y por la cual gira la investigación presentada en este documento, el fármaco contenido o atrapado en las nanoesferas lipídicas que se encuentra en el torrente sanguíneo y dispuesto como parte de una distribución corporal de manera general para atravesar la BHE.

A este respecto, mientras las pequeñas moléculas de fármaco entran normalmente a las células por difusión, este no es generalmente el caso para las nanomedicinas. Los fármacos incluidos en acarreadores nanoparticulados atraviesan la BHE por procesos endocitóticos más que por difusión, primero interactúan con la membrana celular y después son endocitados en vesículas. La NP es degradada y el fármaco es liberado. Se ha demostrado [106] que acarreadores de fármacos estabilizados con poloxámero sensibilizan al grupo de proteínas que muestran resistencia al paso de fármacos, estos es, muestran menos impedimento al paso de estas partículas, y por tanto se mejora el paso del acarreador y el efecto terapéutico en el cerebro. También se ha mostrado que el poloxámero disminuye el secuestro de fármacos por vesículas pinocíticas e inhibe el sistema de detoxificación de glutatión S-transferasa, que impide el paso de fármacos [106]. NP's de polibutilcianoacrilato también han mostrado incrementar el efecto anestésico de dalargin cuando son estabilizadas con tween 85, cuando se empleó el poloxámero 188 se menciona que no hubo efecto una vez administrado por vía oral, y por vía intravenosa no hubo diferencia que cuando se administró el fármaco sólo. Para el incremento del efecto terapéutico se proponen los siguientes mecanismos: 1) cruzar el endotelio capilar cerebral que forma la BHE por difusión pasiva o mediado por receptores específicos, 2) penetrando los capilares fenestrados de los órganos circunventriculares, 3) el fármaco puede ser fagocitado. También se cree posible que los productos de degradación de NP's puedan actuar como promotores de absorción [107]. Con NP's de polibutilcianoacrilato que han mejorado el paso de metotrexato se ha demostrado que con una disminución en el tamaño de partícula (de 345 a 70 nm) se incrementa el paso de fármaco hacia el cerebro. En este caso el mecanismo atribuido como paso en la BHE es un efecto mimético a lipoproteínas de baja

densidad. Destacan la importancia del recubrimiento de las NP's en su efecto producido en el cerebro, cuando se administra NP's sin estabilizante parece disminuir considerablemente el efecto de metotrexato como si no estuviese incluido en estas NP's poliméricas [108]. Se tiene documentado que las nanoesferas lipídicas incrementan la absorción oral de fármacos liposolubles y que además es importante el efecto del estabilizante sobre la absorción en diferentes barreras. El tween 80 y pluronic F-68 incrementan la absorción oral de fármacos liposolubles incluidos en nanoesferas lipídicas, y disminuyen la actividad de la glicoproteína P y citocromo P450. En este punto, hay que destacar que la glicoproteína P es una de las que constituyen al amplio grupo de proteínas que muestran resistencia al paso de fármacos en la BHE y que modula a bombas de transporte activo primario, por lo que si el pluronic F-68 la inhibe, posiblemente también el poloxámero 407 que son de composición casi igual. El clonazepam y nanoesferas lipídicas conteniendo a este fármaco podrían atravesar también vía transporte activo primario. Las nanoesferas lipídicas también protegen al fármaco de degradación enzimática [74, 109, 110]. También, nanoesferas lipídicas estabilizadas con poloxámero 188 han incrementado el paso de Camphotecin hacia el cerebro, se propone en este caso que el paso de NP's a través de la BHE puede ser por difusión simple y endocitosis [111]. Se ha reportado que las nanoesferas lipídicas pueden mostrar más adsorción de apolipoproteína A que la apolipoproteína B (que se había reportado para NP's poliméricas de polibutilcianoacrilato) y de esta manera las NP's son transportadas por el torrente sanguíneo sin sufrir degradación, y en la BHE existen receptores para apolipoproteína A que aumentan el paso de las NP's recubiertas con la adsorción de apolipoproteína A, se da el efecto de caballo troyano [112].

Con lo antes mencionado, se puede observar que no existe un mecanismo predominante para el paso de NP's conteniendo fármacos hacia el cerebro a través de la BHE. Existen diferencias atribuidas al tamaño de partícula, composición matricial, agente estabilizante superficial, fármaco encapsulado, y a la forma en que el fármaco es incluido (difiere si es entrampado o adsorbido)

puesto que según la especificidad del fármaco a receptores de la BHE podrá ser impedido más fácilmente si se encuentra adsorbido o viceversa. Y aunque en esta investigación no se realizó un estudio experimental sobre el mecanismo por el cual las NP's pueden mejorar el paso de fármacos psicoactivos, se puede proponer de acuerdo a las referencias anteriores los siguientes mecanismos probables para nanoesferas lipídicas: 1) las NP's transportan al fármaco cuando llegan a la BHE y entran en contacto con las membranas celulares (con su alta adhesión) son endocitadas, en el interior de las células son degradadas y el fármaco empieza a liberarse (posiblemente parte del fármaco también es degradado), esta fracción libre puede atravesar por difusión la membrana celular y fluir al medio cerebral; 2) la apolipoproteína A ó en todo caso la apolipoproteína B pueden recubrir a las NP's conteniendo al fármaco que pasaron casi intactas después del proceso de digestión, viajan por la circulación general y cuando entran en contacto con la BHE, en donde hay receptores para apolipoproteína A y B son anclados, y atraviesan las NP's la BHE en forma enmascarada, en el interior del cerebro cualquiera de la apolipoproteína es catalizada y la NP's son degradadas liberando al fármaco; 3) el poloxámero 407 adsorbido sobre las nanoesferas lipídicas puede estar sensibilizando a varios receptores (pinocitosis) e inhibiendo la actividad de otros (sistema de detoxificación de glutathione S transferasa, glicoproteína P), de esta forma, disminuye la barrera metabólica y se incrementa el paso de NP's por canales de transporte; 4) difusión simple de las NP's, penetrando los capilares fenestrados.

En realidad, es posible que estos mecanismos se den simultáneamente y cabe la posibilidad que los productos de degradación de NP's provenientes de la digestión y que fueron absorbidos y resintetizados, puedan actuar como promotores de absorción.

En definitiva, las nanoesferas lipídicas incrementan la absorción intestinal de clonazepam y mejoran el paso por la BHE.

VIII. CONCLUSIONES

- i. Se optimizó el método de emulsificación – difusión mediante la evaluación de las etapas consideradas críticas, y por tanto, se obtuvieron dispersiones lipídicas con tamaño de partícula submicrónico y de manera reproducible.

- ii. Con el método de emulsificación – difusión se logró incorporar el clonazepam en las nanoesferas lipídicas. Se obtuvo un porcentaje de encapsulamiento de fármaco entre 0.07 y 0.7 %, con una eficiencia de entrapamiento de 0.07 – 0.15 %, que permitió tener la cantidad suficiente de fármaco como para administrar una dosis que produjera un efecto ansiolítico.

- iii. Las nanoesferas lipídicas obtenidas presentaron un tamaño de partícula promedio de 320 ± 30 nm, las micrografías mostraron partículas esféricas y amorfas, corroboran el tamaño submicrónico y se observó también la formación de nanocristales de clonazepam, mediante calorimetría diferencial de barrido se demostró que el clonazepam se encuentra disperso molecularmente en la matriz lipídica y con la determinación de potencial zeta se caracterizó a la dispersión lipídica submicrónica como con umbral de leve dispersión.

- iv. Las pruebas de estabilidad hasta casi por un año mediante la determinación de tamaño de partícula y potencial zeta demostraron un incremento de aproximadamente 100 nm en el tamaño de partícula y una disminución del potencial zeta de -10 mV aproximándose a un umbral de aglomeración.

- v. Con las evaluaciones *in vivo* se registró un efecto ansiolítico administrando por vía oral nanoesferas lipídicas con clonazepam en dosis terapéutica y aún a la mitad de la dosis terapéutica. Las nanoesferas lipídicas mejoraron la absorción intestinal del clonazepam e incrementaron el efecto terapéutico en comparación de cuando se le administra en dispersión acuosa. Se logró mejorar el paso de clonazepam a través de la BHE.

IX. PERSPECTIVAS

- i. A partir de este estudio se abren nuevas áreas de investigación encaminadas a evaluar el efecto terapéutico *in vivo* de otros fármacos psicoactivos (anticancerígenos, antibacteriales) con diferentes tipos de matrices lipídicas como lípidos simples, grasas, ceras, ó una combinación de ellos para mejorar el encapsulamiento del fármaco.
- ii. Además, es conveniente seguir estudios de estabilidad por más tiempo (aproximadamente 3 años o acelerada).
- iii. Comparar el efecto producido tras la administración de una mezcla acuosa de clonazepam con la matriz lipídica y el estabilizante, una mezcla de nanoesferas lipídicas y clonazepam, y el efecto producido de las nanoesferas lipídicas con el clonazepam encapsulado.
- iv. Aumentar el encapsulamiento del clonazepam y su eficiencia de entrapamiento evaluando diferentes tipos de matrices lipídicas o una combinación de ellos.
- v. Estudiar la liberación *in vitro* de clonazepam en las nanoesferas lipídicas.
- vi. Estudiar el paso de las nanoesferas lipídicas conteniendo clonazepam en barrera hematoencefálica *in vitro*, para determinar el mecanismo de penetración del fármaco en NP's lipídicas.
- vii. Realizar estudios de farmacocinética.
- viii. Hacer estudios de comparación con formulaciones comerciales (tableta y suspensión).

- ix. Determinar el grado de encapsulamiento de otros fármacos psicoactivos.
- x. Evaluar su administración por vía oral e intravenosa.
- xi. Realizar estudios de toxicidad *in vivo* e *in vitro*, con placebos y con nanoesferas conteniendo el fármaco.
- xii. Evaluar el escalamiento del proceso de elaboración y estudios de costo – beneficio para su preparación comercial.

X. REFERENCIAS

1. Lazorthes, Guy, El cerebro y la mente. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, 1987
2. Arthur C. Guyton, Fisiología humana. Nueva editorial interamericana, México, Sexta edición, 1987, pp. 119-121
3. Thompson, Richard F., Fundamentos de psicología fisiológica. Editorial Trilla, México, 1977, pp. 140-144
4. Harper, Harold A., Manual de química fisiológica. El manual moderno S. A., México, 1965
5. A. Goodman Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México, 2003.
6. Flórez, Jesus, Farmacología Humana. 4ª edición, Masson Salvat Edición, Barcelona, 2003
7. Spielberg, Charles, Tensión y ansiedad. Harper & Row Latinoamericana, México, 1980.
8. Cristal, Leonard, Comprenda la psicología: una perspectiva personal. Harper & Row Latinoamericana, México, 1980.
9. <http://www.psicologiacientifica.com/publicaciones/biblioteca/articulos/arvirues01.htm> (2005)
10. Alfonso Velasco Martín, Farmacología fundamental. Mc. Graw Hill – Interamericana, USA, 2003, pp. 268-272.

11. <http://www.dedrogas.com/2005/10/17/benzodiazepinas/> (2005)
12. <http://www.benzo.org.uk/espman/bzcha01.htm> (2006)
13. Pasantes-Morales Herminia, Aréchiga Hugo, Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1983.
14. Bayés Ramón, Iniciación a la farmacología del comportamiento, Conducta humana. Número 31, Fontanella, Barcelona, 1977.
15. A.C. Moffat (Editor), Clarke's Isolation and Identification of Drugs. 2nd Ed. The Pharmaceutical Press, England, 1986
16. M. Teresa Carvajal Figueroa, Rodolfo Pinal Calvillo, Revisión bibliográfica de los aspectos biofarmacéuticos de tres antiepilépticos: carbamazepina, clonazepam y nitrazepam, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México (1984).
17. <http://www.eutimia.com/psicofarmacos/ansioliticos/clonazepam.htm> (2006)
18. Martin F. Fromm, Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. Pharm. Sci., 25 (2004) 423-429
19. Gert Luurtsema, Elizabeth C. M. de Lange, Adriaan A. Lammertsma, Eric J. F. Franssen, Transport across the blood-brain barrier: stereoselectivity and PET-Tracers. Mol. Imag. Bio., 5 (2004) 306-318
20. Rachel C. Brown, Richard D. Egleton, Thomas P. Davis, Mannitol opening of the blood–brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not $^{86}\text{Rb}^+$ or albumin. Brain Res., 1014 (2004) 221-227

21. Praveen Ballabh, Alex Braun, and Maiken Nedergaard, The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neu. Dis.*, 16 (2004) 1-13
22. www.netterimages.com (2005)
23. www.mcg.edu (2006)
24. Jason D. Huber, Richard D. Egleton, Thomas P. Davis, Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosciences*, 24 (2001) 719-725
25. Jillian R. Gee, Jeffrey N. Keller, Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int. J. Bio. Cell Bio.*, 37 (2005) 1145-1150
26. N. Joan Abbott, Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and silico models. *Drug Dis. Today Tech.*, 1 (2004) 407-416
27. Anne M. Wolka, Jason D. Huber, Thomas P. Davis, Pain and the blood-brain barrier: obstacles to drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55 (2003) 987-1006
28. Hans Lennernäs, Ebba Lundgren, Intestinal and blood-brain drug transport: beyond involvement of a single transport function. *Drug Dis. Today Tech.*, 1 (2004) 417-422
29. <http://www.sinapsis.org/barrera.html> (2001)
30. Hiroshi Suzuki, Tetsuya Terasaki, Yuichi Sugiyama, Role of efflux transport across the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier on the

- disposition of xenobiotics in the central nervous system. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 25 (1997) 257-285
31. Hartwing Wolburg, Andrea Lippoldt, Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular Pharm.*, 38 (2002) 323-337
32. Joanna Marie Giddings, Modeling the Behavior of Rats in an Elevated-Plus Maze. Department of Mathematics and Statistics, Acadia University, 2001
33. Nicolas Salomé, Rainer Landgraf and Odile Viltart, Confinement to the Open Arm of the Elevated-Plus Maze as Anxiety Paradigm: Behavioral Validation. *Beh. Neu.*, 120 (2006) 719-723
34. A.P. Carobrez, L.J. Bertoglio, Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neu. Biobeh. Rev.*, 29 (2005) 1193-1205
35. Luis E. Gonzalez, Sandra E. File, A Five Minute Experience in the Elevated Plus-Maze Alters the State of the Benzodiazepine Receptor in the Dorsal Raphe Nucleus. *J. Neu.*, 4 (1997) 1505-1511
36. Pascal Hilber, Pierre Chapillon, Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. *Phy. Beh.*, 86 (2005) 164-167
37. Elsa Brillaud, Delphine Morillion, René de Seze, Modest environmental enrichment: Effect on a radial maze validation and well being of rats. *Brain Res.*, 1054 (2005) 174-182

38. Catherine Belzung, Guy Griebel, Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Beh. Brain Res.* 125 (2001) 141-149
39. F. Calatayud, C. Belzung, A. Aubert, Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. *Beh. Pro.*, 67 (2004) 195-206
40. Leandro J. Bertoglio, Antonio P. Carobrez, Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Beh. Brain Res.*, 132 (2002) 135-143
41. L.J. Bertoglio, A.P. Carobrez, Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharm. Biochem. Beh.*, 72 (2002) 449-455
42. Roseli Boerngen-Lacerda, Maria Lucia O. Souza-Formigoni, Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties?. *Pharm. Biochem. Beh.*, 67 (2000) 225-232
43. Statement for the Record on Nanotechnology by department of health and human services national institutes of health, May 1, 2003
44. Gabriel A. Silva, Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Neuroscience*, 7 (2006) 65-74
45. www.sustainpack.com/nanotechnology.html (2006)
46. Claudio Nastruzzi, *Lipospheres in drug targets and delivery*, CRC Press, USA, 2005, pp. 2-4

47. Eng H. Lo, Aneesh B. Singhal, Vladimir P. Torchilin, N. Joan Abbott, Drug delivery to damaged brain. *Brain Res. Rev.*, 38 (2001) 140-148
48. P. Garberg, M. Ball, N. Borg, R. Cecchelli, L. Fenart, R.D. Hurst, et al, In vitro models for the blood–brain barrier. *Tox. In Vitro*, 19 (2005) 299-334
49. Nicholas Bodor, Peter Buchwald, Recent advances in the targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 36 (1999) 229-254
50. Lisbeth Illum, Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 11 (2000) 1-18
51. Gabor Somogyi, Sinji Nishitani, Daishuke Nomi, Peter Buchwald, Laszlo Prokai, Nicholas Bodor, Targeted drug delivery to the brain via phosphonate derivatives I. Design, synthesis and evaluation of an anionic chemical delivery system for testosterone. *Int. J. Pharm.*, 166 (1998) 15-26
52. Christophe Jollivet, Anne Aubert-Pouessel, Anne Clavreul, Marie-Claire Venier-Julienne, Séverine Remy, Claudia N. Montero-Menei, Jean-Pierre Benoit, Philippe Menei, Striatal implantation of GDNF releasing biodegradable microspheres promotes recovery of motor function in a partial model of Parkinson's disease. *Biomaterials*, 25 (2004) 933-942
53. Jean-Pierre Benoit, Nathalie Faisant, Marie-Claire Venier-Julienne, Philippe Menei, Development of microspheres for neurological disorders: From basics to clinical applications. *J. Control. Rel.*, 65 (2000) 285-296
54. Donald Wong, Katerina Dorovini-Zis, Steven R. Vincent, Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood–brain barrier. *Exp. Neu.*, 190 (2004) 446-455

55. Brian T. Hawkins, Thomas J. Abbruscato, Richard D. Egleton, Rachel C. Brown, Jason D. Huber, Nicotine increases in vivo blood–brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. *Brain Res.*, 1027 (2004) 48-58
56. Brigitte Cosquer, Anne Pereira de Vasconcelos, Jürg Fröhlich, Jean-Christophe Cassel, Blood–brain barrier and electromagnetic fields: Effects of scopolamine methylbromide on working memory after whole-body exposure to 2.45 GHz microwaves in rats. *Behavioural Brain Res.*, 161 (2005) 229-237
57. Rachel C. Brown, Richard D. Egleton, Thomas P. Davis, Mannitol opening of the blood–brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not $^{86}\text{Rb}^+$ or albumin. *Brain Res.*, 1014 (2004) 221-227
58. Alekha K. Dash, William F. Elmquist, Separation methods that are capable of revealing blood-brain barrier permeability. *J. Chromatogr.*, 797 (2003) 241-254
59. P. R. Lockman, R. J. Mumper, M. A. Khan, D. D. Allen, Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28 (2002) 1-13
60. Quintanar-Guerrero D., Allémann E. Fessi H., Doelker E., Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24 (1998) 1113-1117
61. David J. Begley, Michael W. Bradbury, Jörg Kreuter, *The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000

62. Jörg Kreuter, Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47 (2001) 65-81
63. Gupta P. K., Hung C. T., Quantitation of the release of doxorubicin from colloidal carrier for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41 (1995) 62-69
64. J. Kreuter, V. E. Petrov, D. A. Kharkevich, R. N. Alyautdin, Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. *J. Control. Rel.*, 49 (1997) 81-87
65. Rainer H. Müller, Karsten Mäder, Sven Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 50 (2000) 161-177
66. Sylvia A. Wissing, Rainer H. Müller, Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.*, 254 (2003) 65-68
67. Rainer H. Müller, Cornelia M. Keck, Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J. Biotech.*, 113 (2004) 151-170
68. Wolfgang Mehnert, Karsten Mäder, Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47 (2001) 165-196
69. Michele Trotta, Francesca Debernardi, Otto Caputo, Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.*, 257 (2003) 153-160

70. S. A. Wissing, O. Kayser, R. H. Müller, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 56 (2004) 1257-1272
71. Roberta Cavalli, M. Rosa Gasco, Patrizia Chetoni, Susi Burgalassi, M. Fabricio SAettone, Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.*, 238 (2002) 241-245
72. M. A. Schubert, C. C. Müller-Goyman, Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 61 (2005) 77-86
73. Patrick Shahgaldian, Eric Da Silva, Anthony W. Coleman, Beth Rather, Michael J. Zaworotko, Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): a detailed study of preparation and stability parameters. *Int. J. Pharm.*, 253 (2003) 23-38
74. Torsten M. Göppert, Rainer H. Müller, Protein adsorption patterns on poloxamer – and poloxamine – stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 60 (2005) 361-372
75. Emilio Marengo, Roberto Cavalli, Otto Caputo, Lorenzo Rodriguez, Maria Rosa Gasco, Scale-up of the preparation process of solid lipid nanoparticles. Part I. *Int. J. Pharm.*, 205 (2000) 3-13
76. Chrysantha Freitas, Rainer H. Müller, Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 46 (1998) 145-151
77. Soo-Jeong Lim, Chong-Kook Kim, Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.*, 243 (2002) 135-146

78. Alix Dubes, H elene Parrot-Lopez, Wassim Abdelwahed, Ghania DEgobert, Hatem Fessi, Patrick Shahgaldian, Anthony W. Coleman, Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 55 (2003) 279-282
79. Erike Zimmermann, Rainer H. M uller, Electrolyte – and pH – stabilities of aqueous solid lipid nanoparticles (SLNTM) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 52 (2001) 203-210
80. Chrysantha Freitas, Rainer H. M uller, Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticles (SLNTM) dispersions. *Int. J. Pharm.*, 168 (1998) 221-229
81. N. Sch oler, H. Hahn, R. H. M uller, O. Liesenfeld, Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *Int. J. Pharm.*, 231 (2002) 167-176
82. D. Hou, Ch. Xie, K. Huang, Ch. Zhu, The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24 (2003) 1781-1785
83. C. Freitas, R. H. M uller, Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 47 (1999) 125-132
84. B eatrice Heurtault, Patrik Saulnier, Brigitte Pech, Jacques-Emile Proust, Jean-Pierre Benoit, Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24 (2003) 4283-4300
85. T. M. G oppert, R. H. M uller, Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int. J. Pharm.*, 302 (2005) 172-186

86. R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.*, 242 (2002) 121-128
87. R. H. Müller, S. Maassen, C. Schwarz, W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. *J. Control. Rel.*, 47 (1997) 161-269
88. Leyva Gómez Gerardo, Urbán Morlán María Zaida, Calderón Duarte Ana María Xochitl, Lozano Rivas Celene, Ganem Rondero Flora Adriana, Quintanar Guerrero David. Optimización de la técnica de emulsificación-difusión para elaborar nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). III Internacional XXXVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Asociación Farmacéutica Mexicana, AC, Veracruz, México, 27 Noviembre – 1 Diciembre. 2005
89. David Quintanar-Guerrero, David Tamayo-Esquivel, Adriana Ganem-Quintanar, Eric Alléman, Eric Doelker, Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26 (2005) 211-218
90. D. Quintanar Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *Int. J. Pharm.*, 188 (1999) 155-164
91. D. Quintanar Guerrero, A. Ganem-Quintanar, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. *J. Microencapsul.*, 15 (1999) 107-119

- 92.E. Piñón-Segundo, A. Ganem-Quintanar, V. Alonso-Pérez, D. Quintanar-Guerrero, Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *Int. J. Pharm.*, 294 (2005) 217-232
- 93.D. Tamayo-Esquivel, Preparación de dispersiones lipídicas de talla submicrónica por medio del método de emulsificación difusión. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México (2005).
- 94.C. Gutiérrez Escamilla, Potencial uso de la técnica de emulsificación-difusión en la elaboración de nanocápsulas lipídicas. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México (2005).
- 95.E. Piñón-Segundo, Desarrollo tecnológico y caracterización de partículas submicrónicas poliméricas como vectores terapéuticos para el tratamiento de enfermedades periodontales. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México (2003).
96. Nano Series, Malvern Instrument. User Manual. England. 2003
- 97.D. Tamayo-Esquivel, A. Ganem-Quintanar, A. L. Martínez, M. Navarrete-Rodríguez, S: Rodríguez-Romo, D. Quintanar-Guerrero, Evaluation of the Enhanced Oral Effect of Omapatrilat-Monolein Nanoparticles Prepared by the Emulsification-Diffusion Method. *J: Nanoscience Nanotech.*, 6 (2006) 1-5
98. <http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DRUGDATA/32clonazepam.html> (1996)
99. Maria Teresa Carvajal Figueroa, Rodolfo Pinal Valvillo, Revisión bibliográfica de los aspectos biofarmacéuticos de tres antiepilépticos: carbamazepina, clonazepam y nitrazepam. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 1984

100. M.A. Hammad, B.W. Müller, Solubility and stability of clonazepam in mixed micelles. *Int. J. Pharm.* 169 (1998) 55–64
101. <http://www.heidolph-instruments.com> (2006)
102. Rita Cortesi, Elisabetta Esposito, Giovanni Lucab, Claudio Nastruzzi, Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* 23 (2002) 2283–2294
103. María Zaida Urbán Morlán, Desarrollo de un método para la cuantificación de tensoactivos no iónicos de tipo poloxámeros mediante la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2002
104. C. Schwarz, W. Mehnert, Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.*, 157 (1997) 171-179
105. M. Riddick Thomas, Control of Colloid Stability Through Zeta Potential. Zeta-Meter Inc., New York, 1968.
106. Andreas G. Schätzlein, Delivering cancer stem cell therapies – A role for nanomedicines?. *Eu. J. Cancer*, 42 (2006) 1309 –1315
107. Ulrike Schroeder, Petra sommerfeld, Bernhard A. sable, Efficacy of oral dalargin-loaded nanoparticle delivery across the blood-brain barrier. *Peptides*, 4 (1997) 777-780
108. Kepan Gao, Xinguo Jiang, Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 310 (2006) 213-219

109. Ikumi Tamai, Akira Tsuji, Drug delivery through the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 19 (1996) 401-424
110. YiFan Luo, DaWei Chen, LiXiang Ren, XiuLi Zhao, Jing Qin, Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *J. Cont. Rel.*, 114 (2006) 53-59
111. Shi Cheng Yang, Li Fang Lu, Ying Cai, Jia Bi Zhu, Bing Wen Liang, Chang Zheng Yang, Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J. Control. Rel.*, 59 (1999) 299-307
112. A. Gessner, C. Olbrich, W. Schröder, O. Kayser, R. H. Müller, The role of plasma proteins in brain targeting: species dependent protein adsorption patterns on brain-specific lipid drug conjugate (LDC) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 214 (2001) 87-91
113. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq3ctablist.htm> "Guidance for the Industry Q3C-Tables and List" (1997)

XI. ANEXOS

1. EVALUACIONES PREVIAS DE CLONAZEPAM

a) Barrido de clonazepam en cloroformo

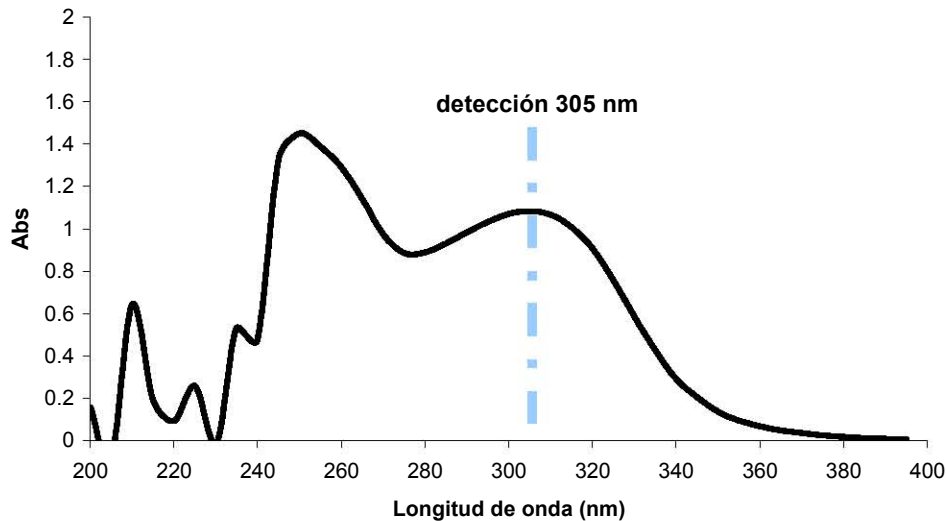


Gráfico 1. Barrido de clonazepam en cloroformo, detección de la absorbividad máxima

Se pesaron 3 mg de clonazepam en una balanza microanalítica y se disolvió con 5 mL de cloroformo en un vaso de precipitado de 20 mL con agitación magnética, posteriormente se trasvaso a un matraz de aforo de 10 mL y se lavó tres veces con 1 mL de cloroformo, finalmente se llevó al volumen de aforo. De la solución anterior se tomó una alícuota de 0.5 mL y se aforó en un matraz volumétrico de 5 mL. Concentración final 0.03165 mg/mL.

Determinación del coeficiente de absorptividad molar.

Concentración molar de clonazepam = 1.00253×10^{-4} mmol

Coeficiente de absorptividad molar del clonazepam = 10772.74496 mL / mmol·cm

b) Curva de calibración de clonazepam en cloroformo.

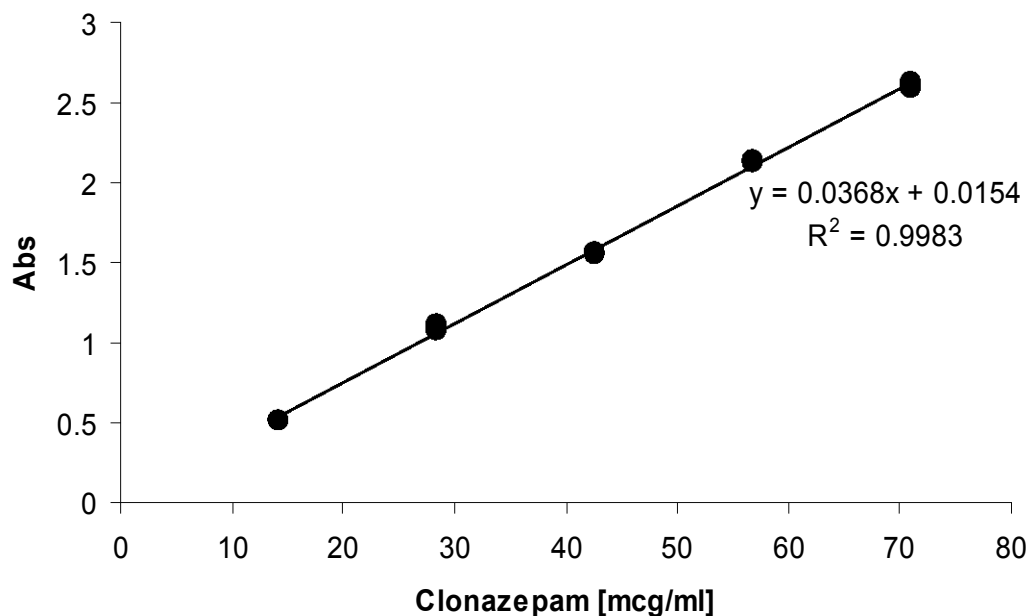


Gráfico 2. Curva de calibración para cuantificar el clonazepam en las nanoesferas lipídicas.

Preparación de la solución estándar.

Se pesaron 14.166 mg de clonazepam en una balanza microanalítica y se disolvió con 50 mL de cloroformo en un vaso de precipitado de 100 mL con agitación magnética, posteriormente se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL y el vaso se lavó tres veces con 10 mL de cloroformo, finalmente se llevó al volumen de aforo.

Preparación de la curva de calibración.

Para preparar las concentraciones de la curva de calibración se tomaron 1, 2, 3, 4 y 5 mL de la solución estándar y posteriormente se aforaron a 10 mL. La

absorbancia de cada sistema se determinó inmediatamente después del aforo para evitar la evaporación del cloroformo y la degradación del principio activo. Cada punto de la curva de calibración se realizó por triplicado. El sistema blanco fue únicamente de cloroformo. Se obtuvo un c.v. del 2.93 % y no se observó una disminución en la concentración de los sistemas atribuible a un posible mecanismo de degradación.

2. FÓRMULAS PARA EXPRESAR EL FÁRMACO ENCAPSULADO

Porcentaje de encapsulamiento de fármaco:

$$E. F. = \frac{\text{cantidad de fármaco en NP's}}{\text{Cantidad de NP's}} \times 100$$

Eficiencia de atrapamiento

$$E. E. = \frac{E. F. (\%)}{\text{Contenido inicial de fármaco (\%)} \times (1 - \text{fracción de alcohol polivinílico})} \times 100$$

La fracción de alcohol polivinílico fue tomado como un valor constante de 0.03 [89] suponiendo la concentración máxima cuantificada en nanopartículas poliméricas

3. PROPIEDADES DEL LÍPIDO

Compritol® ATO 888

Esta constituido por una mezcla de mono, di y triglicéridos del ácido behénico. Su composición de átomos de carbono es la siguiente: C16 (<3.0%), C18 (<5.0%), C20 (<10%), C22 (>83%) y C24 (<3.0%). Tiene una fracción de 12-18% de monoglicéridos, 52-54% de diglicéridos y 28-32% de triglicéridos. Es obtenido a partir de materia prima de origen vegetal.

Usos

Lubricante en la preparación de cápsulas y tabletas, agente aglutinante para la compresión directa, matriz lipofílica para la preparación de sistemas de liberación sostenida de fármacos, tanto en tabletas como en cápsulas.

Toxicidad

Toxicidad aguda del lípido puro por vía oral: DL50 > 2000 mg/kg

Irritación ocular del lípido puro: Media

Irritación cutánea: Ligera

Irritación ocular (5% en aceite de nuez): Bien tolerada

Solubilidad

Soluble en cloroformo, cloruro de metileno caliente. Insoluble en agua, etanol (96°), n-hexano y aceite mineral.

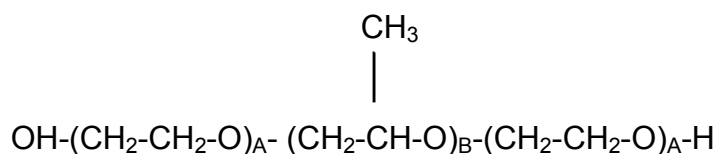
Composición y algunas propiedades fisicoquímicas

Especificación	Descripción
Rango de fusión	69-74 °C
Valor de acidez	< 4.00 mg KOH/g
Valor de saponificación	145 a 165 mg/kg
Contenido de agua	< 1 %
Contenido de glicerol libre	< 1 %
Monoglicéridos totales	13.0-21.0 %
Diésteres totales	40.0-60.0 %
Triésteres totales	21.0-35.0 %
Ácido behénico (C22)	> 83.0 %
Ácido araquídico (C20)	< 10.0 %
Ácido esteárico (C18)	< 5.0 %
Ácido palmítico (C16)	< 3.0 %
Ácido lignocérico (C24:0)	< 3.0 %
Ácido erúcico (C22:1)	< 3.0 %

4. PROPIEDADES DE LOS ESTABILIZANTES

a) Poloxámero 407

Naturaleza química: polioxietileno-polioxipropileno en bloques según la siguiente fórmula:



Donde A = 98 y B = 57

La fracción de polioxietileno es de 73 % p/p

Descripción física: polvo grueso, blanco, casi inodoro e insípido, con consistencia cerosa

Especificaciones farmacopéicas:

Valor de hidroxilo	8-11
Masa molecular calculada a partir del valor de hidroxilo	9840-14600
pH (al 2.5 % p/v en agua)	5.0-7.5
Metales pesados	20 ppm máx.
Agua (método de Kart Fischer)	1 %
Óxido de etileno libre	1 ppm máx.
Punto de fusión (°C)	53-57
Fracción masa de polioxietileno (p/p)	73.2±1.7

Solubilidad: el poloxámero 407 es soluble en agua y en mezclas de alcohol y agua, insoluble en dietil éter, cera de parafina y ácidos grasos.

Aplicaciones: se usa como engrosador, agente gelificante, coemulsificante, agente para dar cuerpo en cremas y emulsiones líquidas. Otra aplicación es como solubilizante de ciertos fármacos y aceites esenciales en preparaciones farmacéuticas y cosméticas.

El poloxámero 407 ha sido reportado como el de menor toxicidad de todos los copolímeros que se encuentran comercialmente disponibles. Muestra una buena biocompatibilidad y debe ser útil como vehículo de fármacos para sistemas de liberación tópicos.

b) Alcohol polivinílico, Mowiol® 4-88

Nombre químico: etenol homopolímero

Fórmula química: $(C_2H_4O)_n$. Peso molecular: 26 000 g/mol

Descripción: polímero sintético, soluble en agua. El valor de “n” para materiales comercialmente disponibles esta entre 500 – 5000, equivalente al rango de peso molecular en aproximadamente 30 000 a 200 000. Es inodoro, de color blanco a crema y tiene forma de polvo granular.

Propiedades fisicoquímicas:

Especificación	Descripción
Gravedad específica 25 °C	1.19-1.31 para el sólido 1.02 para una soln. al 10 % p/v
pH (4 %p/v en agua)	5.0-8.0
Sustancias insolubles en agua	≤ 0.1 %
Viscosidad (dinámica)	4-7 mpas (4% p/v)

Solubilidad: soluble en agua, insoluble en solventes orgánicos. Su disolución requiere de una dispersión del sólido en agua a temperatura ambiente con agitación, seguida de un calentamiento en aproximadamente 90 °C por 5 minutos.

Seguridad: es considerado como un material no tóxico, no irrita la piel ni los ojos a concentraciones de 10 %.

Aplicaciones: agente de recubrimiento, lubricante, agente estabilizante y para incrementar la viscosidad.

5. GUÍA SOBRE IMPUREZAS DE DISOLVENTES RESIDUALES PARA LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.

Requerimientos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano según la ICH (*Internacional Conference on Harmonisation*). Esta guía muestra la opinión actual de la FDA (*Food and Drug Administration*) sobre el tema. En la presente guía se hace una clasificación de los disolventes según su grado de toxicidad.

Disolventes clase 1: disolventes que tienen que ser evitados. Son conocidos por ser carcinógenos y por su alto peligro al medio ambiente.

Disolventes clase 2: disolventes que deben ser usados bajo ciertos límites. Son posibles causantes de efectos tóxicos irreversibles como neurotoxicidad o teratogenicidad.

Disolventes clase 3: son considerados como los disolventes menos tóxicos y con menor riesgo para la salud humana. Esta clase de disolventes no incluye disolventes conocidos como dañinos para la salud en los niveles aceptados para el uso farmacéutico. La cantidad residual de estos disolventes que se considera aceptada sin justificación debe ser de 50 mg por día o menos. Las cantidades mayores a éste límite pueden aceptarse si se considera que van acorde a las capacidades de producción y a las buenas prácticas de manufactura.

Disolventes clase 3

Disolventes	
Ácido acético	Heptano
Acetona	Acetato de isobutilo
Anisol	Acetato de isopropilo
1-Butanol	Acetato de metilo
2-Butanol	3-metil-1-butanol
Acetato de butil	Metil etil cetona
Ter-butilmetil éter	Metil isobutil cetona
Cumene	2-metil-1-propanol
Dimetil sulfóxido	Pentano
Etanol	1-pentanol
Acetato de etilo	1-propanol
Éter etílico	2-propanol
Formiato de etilo	Acetato de propilo
Ácido fórmico	Tetrahidrofurano